



TESIS DOCTORAL

USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

José Javier Rodríguez Calviño

Departamento de Microbiología y Parasitología

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





TESIS DOCTORAL

USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA MEJORA DEL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Fdo.:

JOSÉ JAVIER RODRÍGUEZ CALVIÑO

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015



**BENITO JOSÉ REGUEIRO GARCÍA, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO
DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA**

CERTIFICA:

Que la presente Tesis titulada: “Uso de Nanopartículas Magnéticas y Biología Molecular para la Mejora del Diagnóstico Microbiológico” ha sido realizada, bajo mi dirección, por D. José Javier Rodríguez Calviño en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela y, estimado que se encuentra finalizada, solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Santiago de Compostela, 2015

Fdo.: Prof. Dr. Benito José Regueiro García





Este trabajo fue financiado en parte por el Ministerio de Ciencia e Innovación mediante una beca FPI (BES-2009-018631) asociada al proyecto MAT2008-06503, y por el Fondo de Investigaciones Sanitarias mediante el proyecto PI14/00620.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Benito Regueiro Garcia por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por guiarme y ayudarme durante su realización.

Al Dr. Antonio Aguilera Guirao por ayudarme en mis primeros pasos dentro de un laboratorio.

Al Dr. Eduardo Varela Ledo por habernos enseñado y aportado tanto a todos.

A todos los compañeros del Hospital de Conxo, Ramonita, Elvira, Pilar, Cruz, Lorena, por apoyarme y animarme siempre.

A todos los residentes con los que coincidí en su paso por el Servicio de Microbiología, Ángeles, Patricia, Sandra, Carlos, Luz, Lucía, Gema, Miguel, Dani, Paloma, Gilberto, Javi, Isidro, Xana, Jose, Rocío, Tamara y Aldara, por apoyarme, animarme y todos los buenos ratos que pasamos juntos.

A mis compañeros Pablo, Olaia y Carmen, por las horas de trabajo conjunto aprendiendo unos de otros.

A todos los técnicos y facultativos del Servicio de Microbiología, Marisa, Fernanda, Manoli, Mercedes, M^a Teresa, Carlos, Pepe, Mónica, Luz, Lupe, Tiago, Maica, Teresa, por haberme animado y apoyado todos estos años.

A mis amigos de la facultad, Javier, Antonio, Gonzalo, Bruno, Raquel, Raquelita, Marian, Raul, por todas las horas juntos que nos llevaron a donde estamos hoy.

A mis amigos, Alberto, Tania, Silvia, Javier, Luis, Marta, Luis Q, Martín, Javier E, por tantos años de risas y apoyo que siempre llevaré conmigo.

A mis padres, Manuel y Alicia, por cuidarme y apoyarme, y porque sin ellos nada de esto habría sido posible.

A mis hermanos, Lolo y Tere, por estar siempre ahí, y a mi cuñado Jesús.

A Tania y a Sara, que aún siendo las últimas en llegar a mi vida, me ayudaron más de lo que imaginan en los últimos pasos de este trabajo.

Muchas gracias a todos por estar a mi lado, por apoyarme, por cuidarme, por animarme, y por todas las cosas importantes que aprendí con vosotros y que no podría encontrar en ningún libro.



RESUMEN

A la hora de afrontar el diagnóstico microbiológico, es de vital importancia tanto la preparación previa de la muestra, enfocada en la extracción de ácidos nucleicos, como el poseer técnicas lo suficientemente sensibles y específicas para detectar al microorganismo causante de la infección. El poder contar con sistemas de extracción automáticos basados en nanopartículas magnéticas de adsorción inespecífica a ácidos nucleicos, o con nanopartículas magnéticas de adsorción específica a microorganismos, nos permite la recuperación y concentración de nuestra diana de detección. Esto nos permite mejorar la sensibilidad, así como eliminar cualquier sustancia que pudiese inhibir los procesos posteriores. Además, el contar con técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que nos permite la detección de pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, nos brindan unas herramientas de gran utilidad en el diagnóstico microbiológico. En este sentido, nuestro objetivo es valorar el uso de nuevas nanopartículas magnéticas para la extracción de ácidos nucleicos o para la recuperación de microorganismos, así como mejorar la detección mediante PCR, con un nuevo protocolo de tratamiento previo de la muestra.

Palabras clave: nanopartículas magnéticas, extracción de ácidos nucleicos, separación magnética, viabilidad, diagnóstico molecular.

RESUMO

Á hora de afrontar o diagnóstico microbiolóxico, é de vital importancia tanto a preparación previa da mostra, enfocada na extracción de ácidos nucleicos, como en poseer as técnicas suficientemente sensibles e específicas para detectar o microorganismo causante da infección. O poder contar con sistemas de extracción automáticos basados no uso de nanopartículas magnéticas de adsorción inespecífica a ácidos nucleicos, ou con nanopartículas magnéticas de adsorción específica a microorganismos, permítenos a recuperación e concentración da nosa diana de detección. Isto permítenos mellorar a sensibilidade, así como eliminar calquera sustancia que puidese inhibir os procesos posteriores. Ademais, o contar con técnicas de bioloxía molecular como a reacción en cadea da polimerasa (PCR), que nos permite a detección de pequenas cantidades de ácidos nucleicos, ofrécennos unhas ferramentas de gran utilidade no diagnóstico microbiolóxico. Neste sentido, o noso obxectivo é valorar o uso de novas nanopartículas magnéticas para a extracción de ácidos nucleicos ou para a recuperación de microorganismos, así como mellorar a detección mediante PCR, cun novo protocolo de tratamento previo da mostra.

Palabras chave: nanopartículas magnéticas, extracción de ácidos nucleicos, separación magnética, viabilidade, diagnóstico molecular.

SUMMARY

When addressing microbiological diagnosis, it is vital both prior sample preparation, focused on the extraction of nucleic acids, and possessing techniques sufficiently sensitive and specific to detect the organism causing the infection. To have automatic extraction systems with magnetic nanoparticles based on specific adsorption of nucleic acids, or with magnetic nanoparticles for specific microorganism's adsorption, allows the recovery and concentration of our target. This let us to improve detection sensitivity, and also the elimination of any subs

which may inhibit subsequent processes. In addition, having molecular biology techniques such as polymerase chain reaction (PCR), which allows the detection of small amounts of nucleic acids, give us some useful tools in microbiological diagnosis. On this way, our objective is to evaluate the use of new magnetic nanoparticles for the extraction of nucleic acids or for the recovery of microorganisms, as well as improved detection by PCR with a new protocol pretreatment of the sample.

Keywords: magnetic nanoparticles, nucleic acids extraction, magnetic isolation, viability, molecular diagnostic.







ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 La nanotecnología en el ámbito clínico | 3 |
| 1.1.1 Nanopartículas aplicadas al diagnóstico microbiológico | 5 |
| 1.1.2 Métodos de extracción de ácidos nucleicos | 7 |
| 1.1.3 Nanopartículas superparamagnéticas | 12 |
| 1.1.4 Automatización de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos | 14 |
| 1.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas | 15 |
| 1.2.1 Coprecipitación | 16 |
| 1.2.2 Reacciones en medios restringidos | 17 |
| 1.2.3 Reacciones hidrotermales y de alta temperatura | 17 |
| 1.2.4 Reacciones sol-gel | 18 |
| 1.2.5 Métodos poliol | 18 |
| 1.2.6 Síntesis por inyección en flujo | 18 |
| 1.2.7 Métodos electroquímicos | 19 |
| 1.2.8 Métodos aerosol/ vapor | 19 |
| 1.2.9 Sonolisis | 19 |
| 1.3 Estabilización de partículas magnéticas | 19 |
| 1.3.1 Estabilizadores monoméricos | 20 |
| 1.3.2 Polímeros estabilizadores | 22 |
| 1.4 Diagnóstico microbiológico del <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina 22 | |
| 1.5 PCR y diagnóstico | 24 |
| 1.5.1 Definición de PCR | 24 |
| 1.5.2 Etapas de la PCR | 24 |
| 1.5.3 Parámetros de la PCR | 26 |
| 1.5.4 Variantes de la PCR convencional | 28 |
| 1.5.5 Análisis de los productos de amplificación de la PCR | 29 |
| 1.5.6 PCR a Tiempo Real | 30 |
| 1.5.7 Utilidad de la PCR en el diagnóstico microbiológico | 36 |
| 1.6 Viabilidad y PCR | 36 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.6.1 | Viabilidad: relevancia clínica | 40 |
| 1.6.2 | Colorantes vitales: Monoazida de Etidio (EMA) y Monoazida de Propidio (PMA) 42 | |
| 1.6.3 | PCR de viabilidad (v-PCR) | 44 |
| 2. | OBJETIVOS | 51 |
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS | 57 |
| 3.1 | Nanopartículas y extracción de ácidos nucleicos (adsorción inespecífica) | 59 |
| 3.1.1 | Valoración inicial del rendimiento con el sistema comercial HAMILTON kPCR (SIEMENS) | 59 |
| 3.1.2 | Nanopartículas para la mejora en la extracción de ácidos nucleicos | 59 |
| 3.1.3 | Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias transformadas | 62 |
| 3.1.4 | Enzimas de restricción | 63 |
| 3.1.5 | Obtención de poblaciones estándar de ácidos nucleicos | 63 |
| 3.1.6 | Medida de las concentraciones de ADN para calcular el rendimiento de las extracciones | 65 |
| 3.1.7 | Ensayos de extracción de ácidos nucleicos usando nuevas nanopartículas | 66 |
| 3.2 | Diagnóstico microbiológico del <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina | 66 |
| 3.2.1 | Sistema Microscan Walkaway® Plus (Siemens)..... | 68 |
| 3.2.2 | Difusión con disco de cefoxitina | 68 |
| 3.2.3 | BDMax™ MRSA Assay (Becton Dickinson) | 69 |
| 3.2.4 | LightCycler® MRSA Advanced Test (Roche)..... | 69 |
| 3.2.5 | Sistema Vitek®2 (bioMérieux) | 69 |
| 3.2.6 | Prueba de la coagulasa..... | 69 |
| 3.2.7 | BDMax™ Staph SR (Bekton Dickinson)..... | 69 |
| 3.2.8 | GenoType® MRSA (Hain Lifescience) | 70 |
| 3.2.9 | FluoroType® MRSA (Hain Lifescience) | 70 |
| 3.2.10 | Análisis de distancias genómicas (Diversilab™ <i>Staphylococcus</i> kit (bioMerieux))..... | 70 |
| 3.2.11 | Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI Biotyper (BRUKER)) | 71 |
| 3.2.12 | Tipado en base a la región SCCmec | 71 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.3 | Detección de microorganismos mediante adsorción específica con nanopartículas | 71 |
| 3.3.1 | Sistemas de detección | 72 |
| 3.3.2 | Cepas de referencia y medios de cultivo | 72 |
| 3.3.3 | Tipos de nanopartículas | 73 |
| 3.3.4 | Pruebas de captura de microorganismos..... | 73 |
| 3.4 | Mejora de la detección molecular (PCR de viabilidad) | 76 |
| 3.4.1 | Esquema general del protocolo de tratamiento con cisplatino en el test de viabilidad | 76 |
| 3.4.2 | Cepa de referencia y preparación de la muestra | 77 |
| 3.4.3 | Extracción de ácidos nucleicos y detección mediante PCR a tiempo real . | 77 |
| 3.4.4 | Búsqueda de sustancias..... | 78 |
| 3.4.5 | Pruebas con Monoazida de Etidio (EMA)..... | 79 |
| 3.4.6 | Prueba de control con ADN libre tratado con cisplatino | 80 |
| 3.4.7 | Condiciones iniciales de trabajo con cisplatino..... | 81 |
| 3.4.8 | Pruebas de tratamiento con oxaliplatino..... | 81 |
| 3.4.9 | Protocolo de tratamiento con cisplatino usando centrifugación | 81 |
| 3.4.10 | Mezcla de bacterias vías y muertas (VM) | 83 |
| 3.4.11 | Protocolo de tratamiento con cisplatino en sangre usando centrifugaciones | 83 |
| 3.5 | Nanopartículas y viabilidad (Test de viabilidad)..... | 84 |
| 3.5.1 | Captura de bacterias muertas..... | 84 |
| 3.5.2 | Sistema automático usado en los ensayos con partículas | 84 |
| 3.5.3 | Protocolo viabilidad en solución con las nanopartículas de NANO MR ... | 85 |
| 3.5.4 | Protocolo de viabilidad en solución con las nanopartículas ApoH | 86 |
| 3.5.5 | Protocolo de viabilidad en sangre usando nanopartículas | 87 |
| 3.6 | Ensayo sobre bacterias muertas por tratamiento antibiótico..... | 88 |
| 4. | RESULTADOS | 91 |
| 4.1 | Nanopartículas y extracción de ácidos nucleicos (adsorción inespecífica) | 93 |
| 4.1.1 | Valoración inicial del rendimiento con el sistema comercial HAMILTON kPCR (SIEMENS)..... | 93 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.2 | Valoración de nuevas nanopartículas en el sistema HAMILTON kPCR (SIEMENS)..... | 93 |
| 4.1.3 | Comparativa con la medida de referencia en el HAMILTON kPCR | 95 |
| 4.1.4 | Funcionalización de las partículas | 96 |
| 4.2 | Diagnóstico microbiológico del <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina | 96 |
| 4.3 | Detección de microorganismos mediante adsorción específica con nanopartículas | 101 |
| 4.3.1 | Pruebas de captura de microorganismos: partículas NANO MR | 101 |
| 4.3.2 | Pruebas de Captura de microorganismos: partículas ApoH | 104 |
| 4.3.3 | Recuentos en placa de las soluciones de trabajo | 106 |
| 4.4 | Mejora de la detección molecular (PCR de viabilidad) | 107 |
| 4.4.1 | Pruebas con Monoazida de Etidio (EMA)..... | 107 |
| 4.4.2 | Prueba de control de cisplatino con ADN libre | 109 |
| 4.4.3 | Condiciones iniciales de trabajo con cisplatino | 109 |
| 4.4.4 | Prueba de viabilidad usando centrifugaciones..... | 112 |
| 4.4.5 | Prueba de viabilidad en sangre usando centrifugaciones | 114 |
| 4.4.6 | Prueba de viabilidad con oxaliplatino..... | 115 |
| 4.4.7 | Pruebas con otras sustancias con efecto citostático | 116 |
| 4.5 | Nanopartículas y viabilidad (test de viabilidad) | 118 |
| 4.5.1 | Prueba de captura de bacterias muertas usando nanopartículas | 118 |
| 4.5.2 | Prueba de viabilidad en sangre usando nanopartículas..... | 118 |
| 4.6 | Ensayo sobre bacterias muertas por tratamiento antibiótico..... | 121 |
| 5. | DISCUSIÓN | 125 |
| 5.1 | Diseño de nanopartículas para la mejora de la extracción de ácidos nucleicos | 127 |
| 5.2 | Diagnóstico microbiológico del <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina | 130 |
| 5.3 | Uso de nanopartículas magnéticas para la captura de microorganismos y posterior detección..... | 132 |
| 5.4 | Diseño de un protocolo de viabilidad para la detección diferencial de microorganismos vivos y muertos | 137 |
| 5.5 | Aplicación del protocolo de viabilidad en sangre | 141 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 5.6 | Aplicación del protocolo de viabilidad a partir de sangre con bacterias usando nanopartículas magnéticas | 142 |
| 5.7 | Protocolo de viabilidad sobre bacterias muertas por tratamiento antibiótico .. | 143 |
| 6. | CONCLUSIONES..... | 147 |
| 7. | BIBLIOGRAFÍA | 153 |





1. INTRODUCCIÓN





1.1 LA NANOTECNOLOGÍA EN EL ÁMBITO CLÍNICO

Desde hace tiempo, la investigación y desarrollo en el campo de los nanomateriales ha cobrado importancia, en diferentes campos de aplicación; a medida que se iban descubriendo nuevas propiedades de distintos materiales a escala nanométrica. Este campo de la nanotecnología ya es considerado por muchos como la nueva “gran revolución”, ya que este salto tecnológico, para controlar materiales a escala nanométrica, ha conducido en los últimos 10-15 años al desarrollo de sistemas nanométricos, como las nanopartículas. Además, se han encontrado aplicaciones para estas en campos que abarcan desde la electrónica y la comunicación, pasando por la óptica, química, energía y, por supuesto, la biología (1). Esto la ha hecho pasar de una especialidad propia de físicos y químicos, a una iniciativa científica y empresarial en todo el mundo (2).

Cuando hablamos de nanociencia, nos estamos refiriendo al estudio de las propiedades de los objetos a un tamaño nanométrico, y al ordenamiento de todo ese conocimiento. En cambio, cuando hablamos de nanotecnología, nos estamos refiriendo a la aplicación del conocimiento ofrecido por la nanociencia para que, aplicando estas nuevas propiedades conocidas, poder obtener mejoras en productos y materiales existentes, o bien, proponer otros totalmente nuevos. Y si este estudio y aplicaciones de nuevos materiales lo enmarcamos en el campo médico, estaríamos hablando de nanomedicina (3).

La nanotecnología abarca los materiales, aparatos y sistemas cuya función y estructura son relevantes a pequeñas escalas de tamaño, en el rango de 1-100 nm. En este rango de tamaños encontramos, por ejemplo, estructuras biológicas básicas como el ADN (diámetro de 2 nm) o las membranas celulares (grosor de ~10 nm). Aquí, cabe destacar la capacidad de construir nanoestructuras artificiales de dimensiones comparables, como pueden ser nanoporos de ~2 nm, nanocables inorgánicos de ~10 nm o nanopartículas esféricas de 10 a 100 nm de diámetro (4).

Lo interesante de estos materiales, es que van a presentar propiedades que no aparecerían fuera de este tamaño nanométrico. Se sabe que, los electrones de la superficie de los materiales, tienen un comportamiento diferente al de los que se encuentran en su interior. Y a medida que un objeto disminuye más y más su tamaño, la proporción de átomos que conforman su superficie van aumentando. Esto, lo que hace es que vayan tomando una mayor relevancia las propiedades y comportamiento de esos átomos, respecto a los situados en el interior. Esto se manifiesta en la aparición de estas nuevas propiedades de los materiales debido a que, muchas propiedades eléctricas, magnéticas u ópticas, se van a ver modificadas a medida que varía el tamaño del objeto/ material (3). Por eso, si se es capaz de controlar el tamaño y la forma de un nanoobjeto, se van a poder controlar sus propiedades con una finalidad o intención determinada. Teniendo esto en

cuenta, se puede decir que el objetivo de la nanotecnología es controlar la forma, el tamaño y el orden interno de los nanoobjetos y las nanoestructuras, para modificar a voluntad sus propiedades, con el objetivo de crear sistemas con una funcionalidad o utilidad concreta.

Las nanopartículas pueden hacerse de una amplia variedad de materiales, como metales (oro, plata), óxidos metálicos (dióxido de titanio (TiO_2), dióxido de sílice (SiO_2)), materiales inorgánicos (nanotubos de carbono, “quantum dots”), materiales poliméricos y lípidos (2, 5), generando así una gran variedad de nanopartículas con propiedades diversas. Esto, lo que nos proporciona, son distintas aplicaciones funcionales que permiten que se esté desarrollando una gran cantidad de tecnología, con variedad de aplicaciones en diversos campos, donde destaca su aplicación médica con fines diagnósticos y terapéuticos (2, 6). En la Tabla 1 se muestran ejemplos de los principales tipos de nanopartículas que nos podemos encontrar en base a su naturaleza. La aplicación de esta nueva tecnología en el ámbito de la asistencia sanitaria, la nanomedicina, sigue experimentando un gran desarrollo. Éste le brinda un potencial prometedor para revolucionar los tratamientos médicos y las terapias, en áreas como imagen, diagnóstico rápido y regeneración tisular. Pero también ofrece muchas posibilidades en importantes líneas de investigación, como las centradas en el uso de nanopartículas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, HIV y diabetes, o como transportadores en la administración de fármacos (1, 2). De este modo, nos encontramos con materiales y aparatos de dimensiones nanométricas (1-100 nm) que ya están aprobados para su uso clínico, así como numerosos productos que están siendo evaluados en ensayos clínicos (7). Esta relevancia ganada por la nanotecnología en el campo médico, es debida a la capacidad de producir materiales de tamaño reducido y con efectos dirigidos de forma específica. Esto se debe a que, con tamaños que van de 100-10.000 veces más pequeños que la célula humana, y con su mayor área superficial relativa respecto a su volumen, estos materiales pueden interactuar fácilmente con biomoléculas (como enzimas y receptores), tanto en la superficie como en el interior celular (6). Sin embargo, también hay aspectos toxicológicos y cuestiones éticas que acompañan a la nanomedicina, y que podrían ensombrecer el prometedor futuro de este campo emergente y frenar su avance (1).

| | | |
|----------------------------|-----------------------------------|---|
| Nanopartículas orgánicas | Nanopartículas poliméricas | Utilizadas en aplicaciones médicas. No obstante, presentan una biodistribución no específica y una baja capacidad de carga. |
| | Dendrímeros | Macromoléculas definidas, que presentan una estructura altamente ramificada formada por un núcleo y múltiples ramas. Su estructura molecular les permite cargar diferentes agentes activos. |
| | Liposomas | Nanosistemas esféricos formados por una bicapa lipídica que permiten la encapsulación de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. A pesar de estar ampliamente estudiados, una de sus principales desventajas es su rápida eliminación. |
| | Micelas | Agregados coloidales de moléculas amfifílicas. Las micelas están formadas por una parte interna hidrofóbica y una externa hidrofílica que permite la internalización de fármacos de carácter apolar para su vehiculización. |
| Nanopartículas inorgánicas | Nanopartículas de sílice | Las nanopartículas de sílice son inertes, biodegradables y presentan una buena biodistribución. Son fácilmente sintetizables y se pueden obtener de distinta forma y tamaño. |
| | Nanopartículas de oro | Nanopartículas metálicas que presentan unas propiedades ópticas y electrónicas que dependen totalmente de su forma y tamaño. No presentan toxicidad intrínseca. Además son fácilmente funcionalizables mediante la formación de puentes Au-SR. |
| | Nanopartículas de óxido de hierro | Nanopartículas de óxido de hierro, típicamente de magnetita (Fe ₃ O ₄), biocompatibles y fácilmente biodegradables. Tienen gran potencial en biomedicina dada su capacidad intrínseca de ser monitorizadas <i>in vivo</i> por técnicas de resonancia magnética nuclear. |
| | Quantum dots (QD) | Nanopartículas activas que se utilizan generalmente como sondas para imagen, ya que presentan elevados rendimientos cuánticos de fluorescencia, elevada fotoestabilidad y una emisión fluorescente que puede ser variable mediante el tamaño. Sin embargo, los QD no son biodegradables ni biocompatibles con el organismo, lo que restringe bastante su uso en aplicaciones médicas. |
| | Nanotubos de carbono | Monocapas de grafeno enrolladas en forma de cilindros. Presentan una elevada superficie específica que permite anclar una amplia variedad de moléculas terapéuticas. |

Tabla 1: Principales tipos de nanopartículas y sus aplicaciones. Tabla extraída de et a Llina MC et al (8).

1.1.1 Nanopartículas aplicadas al diagnóstico microbiológico

En el ámbito del diagnóstico microbiológico, y más concretamente en el uso de técnicas de biología molecular, un punto de gran importancia es la obtención de ácidos nucleicos a partir de una gran diversidad de muestras clínicas. Estas pueden ser de

múltiples tipos y orígenes, en donde los microorganismos de interés se van a encontrar mezclados con variedad de sustancias que es necesario eliminar, para obtener de forma lo más pura posible, los ácidos nucleicos del posible agente infeccioso. Esto nos va a permitir su posterior uso en técnicas como PCR, RT-PCR, QPCR, secuenciación, blotting, clonaje, etc. La extracción y purificación de ácidos nucleicos se sigue realizando de forma manual, con métodos que utilizan solventes orgánicos o sales caotrópicas con o sin columnas con gel de sílice (9), y que se basan en las técnicas de separación cromatográfica de macromoléculas biológicas.

El paso de extracción de ácidos nucleicos es, de especial importancia, en cierto tipo de muestras que contienen sustancias capaces de inhibir las reacciones llevadas a cabo en pruebas posteriores, como por ejemplo, la PCR. Algunas muestras como orina, medios de hemocultivo, secreciones vaginales, etc., contienen diversas sustancias que degradan la polimerasa, con lo que van a inhibir la PCR, dando lugar a falsos negativos (10).

De ahí la importancia de tener sistemas de extracción basados en nanopartículas capaces de capturar, de forma efectiva, la mayor cantidad posible de ácidos nucleicos de una muestra. Además, deben recuperarlos de la forma más pura posible, consiguiendo eliminar restos de cualquier sustancia que pudiese interferir en cualquier proceso posterior en el que sean utilizados. Pero nos encontramos con que, tanto los sistemas de extracción automáticos basados en nanopartículas magnéticas, como los sistemas manuales de extracción basados en la filtración con columna de sílice, utilizan una metodología basada en la adsorción inespecífica de los ácidos nucleicos a su superficie. Esto implica que, cualquier material genético presente en una muestra, como por ejemplo ADN humano en una muestra de sangre, va a ser recuperado aunque no sea la diana buscada. Esto, en algunos casos, puede llegar a suponer un problema si la cantidad de ese material genético no deseado está en una cantidad demasiado elevada, ya que puede llegar a inhibir la amplificación de nuestra diana. Un ejemplo claro es lo que pasa en un paciente con sepsis que presenta una elevada leucocitosis, ya que este exceso puede llevar fácilmente a la inhibición de la amplificación mediante PCR, impidiendo la detección del microorganismo causante. Aunque esta importancia no se limita exclusivamente al ámbito sanitario, si no que en otros tipos de muestras, como por ejemplo, en el ámbito del control alimentario, muestras ambientales, etc, también nos podemos encontrar con la necesidad de eliminar sustancias que puedan interferir en procesos posteriores, así como el exceso de material genético que también se pudiese encontrar.

Por todo esto, la posibilidad de conseguir métodos de extracción que nos permitan recuperar el material genético de los microorganismos presentes en una muestra, para mejorar así su detección, serían de gran utilidad. Una estrategia que nos permitiría esta mejora en la obtención de este material genético sería el uso de nanopartículas

magnéticas que, al contrario de las comúnmente utilizadas, se basen en la adsorción específica de moléculas de interés en el diagnóstico tanto microbiológico (ácidos nucleicos de microorganismos), como en la detección de marcadores proteicos que puedan estar presentes en sangre en pequeñas cantidades, para poder favorecer así su concentración y posterior detección aumentando así la sensibilidad (11). Como ejemplos de esta estrategia, nos encontramos con la detección de determinados antígenos tumorales en sangre, como el antígeno específico tumoral de próstata (PAS) (12), o en la medida de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer, presentes en líquido cefalorraquídeo (13).

Otro modo de usar la adsorción específica a partículas magnéticas es la posibilidad de capturar, de forma directa, microorganismos a partir de cualquier muestra, pudiendo recuperarlos totalmente libres de cualquier resto de otras sustancias o tipos celulares. Un ejemplo lo encontramos en el trabajo de Lev Bromberg et al (14), que utilizan nanopartículas de magnetita funcionalizadas con PHMBG (poly(hexametileno biguanidina)). Este compuesto contiene grupos biguanidina, que son estéricamente complementarios a los grupos fosfato y a los segmentos hidrofóbicos de hexametileno del LPS (lipopolisacárido), que se encuentra presente en las bacterias gram negativas. Los ensayos los realizan con la bacteria *E. coli*, consiguiendo porcentajes de recuperación que van del 65% a >99% en función de la concentración de partículas. La parte negativa es que, al entrar en contacto con las nanopartículas, se produce la muerte de las bacterias.

Este tipo de aproximación, usando nanopartículas, es la que se ha llevado a cabo en nuestros ensayos, para la recuperación de ácidos nucleicos y de microorganismos para su posterior detección.

1.1.2 Métodos de extracción de ácidos nucleicos

La purificación o aislamiento de ácidos nucleicos es el primer paso a dar para poder realizar las múltiples técnicas de biología molecular. El disponer de métodos para la obtención de ácidos nucleicos con distintos grados de pureza, y en cantidad suficiente, es importante para que puedan ser usados en los procesos posteriores. Existen muchos métodos para llevar a cabo la extracción y purificación de ácidos nucleicos, por lo que la elección de uno u otro se va a basar en diferentes aspectos como pueden ser:

- El ácido nucleico diana (ssADN, dsADN, ARN total, ARNm)
- El organismo de origen (mamíferos, plantas, bacterias, virus)
- El material de origen (órgano completo, tejido, cultivo celular, sangre)
- El resultado obtenido (cantidad, pureza, tiempo necesario)
- Las aplicaciones posteriores en que será usado (PCR, clonaje, hibridación, síntesis de ADNc)

Aunque de forma general, se suele hablar de la extracción de ácidos nucleicos como el proceso global con el que se obtienen estos a partir de una muestra, en realidad deberíamos hablar de dos pasos que componen el proceso global: la extracción y la purificación. Cuando hablamos de la extracción de los ácidos nucleicos, nos deberíamos referir al proceso por el cual se consigue sacar de las células su material genético. Por otro lado, el proceso de purificación consiste en retirar del medio todos los restos celulares y demás sustancias, quedándonos solamente con los ácidos nucleicos (15).

1.1.2.1 Métodos de extracción

La extracción de ácidos nucleicos a partir de material biológico implica, principalmente, la lisis celular, que permitirá la liberación de todos sus elementos, incluyendo los ácidos nucleicos. Pero esta liberación va a implicar la exposición a nucleasas celulares y a otras sustancias presentes en el medio, que pueden degradar y eliminar los ácidos nucleicos, impidiéndonos así su recuperación y posterior uso. Para proteger frente a la acción de estas nucleasas, se suelen usar sales caotrópicas o proteasas específicas, que van a poder bloquearlas o degradarlas. Y posteriormente, todos los restos celulares van a poder ser eliminados fácilmente mediante centrifugación o precipitación.

La elección del método de lisis es importante, ya que debe ser lo suficientemente fuerte para romper la muestra de inicio (sangre, tejido), pero siendo capaz de preservar la integridad de los ácidos nucleicos. Los procedimientos de lisis suelen incluir:

- Lisis mecánica
- Tratamiento químico (detergente de lisis, agentes caotrópicos)
- Digestión enzimática (proteasas)

Por lo general, la lisis y la neutralización de las nucleasas suele hacerse de forma conjunta, usando para ello una única solución que contiene detergentes para solubilizar las membranas celulares, junto con sales caotrópicas para la inactivación de los enzimas celulares. En el caso particular de células bacterianas se emplea, comúnmente, el enzima lisozima, que se encarga de catalizar la degradación de la pared celular. Para facilitar la solubilización de los componentes celulares y la ruptura de membranas y complejos proteicos, la solución de lisis contiene un detergente iónico como el SDS (dodecilsulfato sodico), que se encarga de dispersar los componentes de las membranas y de desnaturalizar las proteínas. Además, la solución de lisis contiene un agente quelante de cationes divalentes como es el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), que va a impedir la acción de las ADNasas (dependientes de Mg^{++}), aunque no tiene efectos sobre la mayor parte de las ribonucleasas. En el caso de los ARN, como son mucho menos estables que el ADN, y debido a la gran cantidad y actividad de las ribonucleasas celulares y de posibles contaminaciones de la muestra, es necesario usar pasos especiales para ayudar a preservarlos, incluyendo el uso de agentes con gran actividad desnaturalizante o inhibidores específicos capaces de inactivarlas.

1.1.2.2 Métodos de purificación

La purificación nos va a permitir separar los ácidos nucleicos de todos los componentes de la matriz de la muestra y de los restos celulares resultantes del proceso de lisis, pudiendo así recuperarlos de forma pura para su posterior uso en las técnicas moleculares que se necesiten. Estos métodos suelen usar combinaciones de pasos de extracción/ precipitación en fase líquida, separación cromatográfica, centrifugación, separación electroforética y separación por afinidad.

1.1.2.2.1 Extracción/ precipitación

La extracción en solución se usa a menudo para limpiar de contaminantes los ácidos nucleicos. Para la eliminación de proteínas se suele usar la combinación de fenol y cloroformo. También se puede hacer una precipitación selectiva, que nos permite purificar los ácidos nucleicos. Así, con el uso de altas concentraciones de sales (“salting out”) o cambios en el pH, podemos conseguir la precipitación de proteínas, separándolas de nuestros ácidos nucleicos. El uso de los métodos de precipitación nos permite la purificación y la concentración de los ácidos nucleicos. La base de esta precipitación está en conseguir, de forma simultánea, la neutralización de las cargas negativas (añadiendo sales) y la deshidratación de la molécula (mediada por el uso de alcoholes como el etanol o el isopropanol. Estos dos procesos culminan con la precipitación de los ácidos nucleicos, recuperándolos sin impurezas y permitiendo concentrarlo.

1.1.2.2.2 Cromatografía

La cromatografía es una técnica de separación de solutos de una mezcla, que se basa en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento. A este disolvente se le llama fase móvil, y el medio poroso puede ser la fase estacionaria, o bien servir de soporte a esta fase. Se habla de cromatografía en columna cuando la fase estacionaria o su soporte están contenidos en una columna. La separación cromatográfica constituye un proceso dinámico que permite un intercambio continuo, por desplazamiento de una fase con respecto a la otra. El diferente reparto de solutos entre las fases móvil y estacionaria es la causa de la separación de los solutos. El soluto que tiene mayor afinidad por la fase estacionaria se moverá con mayor lentitud. Según el principio que usan para la separación nos encontramos con distintos tipos (16-20):

1. Cromatografía de Reparto

Está basada en la separación o reparto de una mezcla de solutos entre la fase móvil (disolvente) y la fase estacionaria soportada sobre un sólido adecuado, de acuerdo a las distintas solubilidades de estos solutos en ambas fases. Si el disolvente es un líquido, se denomina cromatografía líquida. Son cromatografía de reparto la cromatografía en papel y la cromatografía en capa fina (TLC).

2. Cromatografía de exclusión molecular

Se basa en las propiedades de cribado molecular que ofrecen las partículas de gel porosas. A partir de una matriz con un tamaño de poro determinado, se va a conseguir que las moléculas más pequeñas penetren en los poros por difusión, necesitando más tiempo para desplazarse por toda la matriz. Mientras tanto, las de mayor tamaño son excluidas de los poros y eluidas en la fase líquida en menor tiempo. De este modo, las moléculas son eluidas en un orden decreciente de tamaño molecular donde salen primero aquellas de mayor tamaño.

3. Cromatografía de intercambio iónico

Es el método más utilizado para la separación de ácidos nucleicos. Depende de la interacción electrostática entre la molécula diana y un grupo funcional en la matriz de la columna. Es decir, la base de esta separación es el intercambio reversible de los iones en solución con los grupos funcionales unidos covalentemente a una fase estacionaria insoluble, llamada resina. Por ejemplo, un ácido nucleico con carga negativa a pH 7.0, se unirá a un intercambiador iónico con grupos cargados positivamente, pero eluirá de la columna al cambiar al pH del tampón (tampón de elución). Esto se debe a que los iones del tampón de elución interactúan con los grupos cargados del ácido nucleico o del intercambiador iónico, respectivamente. Así, primero eluirán de la columna las moléculas cargadas positivamente, que no se pueden unir a la fase estacionaria, y posteriormente, al añadir el tampón de elución, eluirán las moléculas con poca carga negativa neta. Finalmente, eluirán las de mayor carga negativa neta. La técnica permite, en un corto periodo de tiempo, la concentración y separación de moléculas a partir de grandes volúmenes.

Una modificación de este método es la extracción en fase sólida, en la que se utiliza una matriz intercambiadora de aniones empaquetada en columnas de polipropileno. La unión se produce bajo condiciones de baja salinidad, y durante los pasos de lavado y elución se va incrementando la concentración de sales en los tampones correspondientes. Las impurezas se eliminan debido a su diferente capacidad de unión, obteniendo así una rápida y eficiente purificación de los ácidos nucleicos (DNA y/o RNA).

4. Cromatografía de adsorción

Se basa en la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas. Bajo condiciones nativas, los ácidos nucleicos están recubiertos de una capa hidratante de moléculas de agua, que mantienen la solubilidad del DNA en soluciones acuosas. Con la adición de iones caotrópicos a los ácidos nucleicos, se destruye esta estructura ordenada de moléculas de agua de la capa hidratante, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del DNA. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, los ácidos nucleicos se unen perfectamente a la membrana de sílice o vidrio de las columnas, mientras que las proteínas, los metabolitos y otros contaminantes, no se

unen. De este modo son eliminados de la muestra durante los pasos de lavado. Posteriormente, los ácidos nucleicos se eluyen de la membrana mediante el uso de tampones de elución con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos), o simplemente agua, ya que permiten recuperar la capa hidratante de los ácidos nucleicos, liberándolos así de la membrana.

Con esta tecnología, no se produce ningún efecto sobre las moléculas de los ácidos nucleicos, ya que la unión intramolecular de los mismos no es de naturaleza hidrofóbica. Con este rápido proceso de purificación, mediante la tecnología de la adsorción-desorción sobre membranas de sílice, se obtienen ácidos nucleicos altamente purificados y listos para usar en procesos posteriores como PCR, RT-PCR, QPCR, secuenciación, blotting, clonaje, etc.

5. Cromatografía de afinidad

Se trata de una adaptación altamente específica de la cromatografía de adsorción. Un ligando inmovilizado reconoce, y se une, a una estructura particular en una biomolécula. Mediante lavados se eliminan los componentes no unidos, que presentan diferentes estructuras. Finalmente, una molécula competidora, que también reconoce el ligando inmovilizado, ocupa las regiones de unión en la matriz de afinidad, liberando así la biomolécula que estaba unida permitiendo su recuperación.

1.1.2.2.3 Centrifugación

La centrifugación selectiva es un método de purificación muy potente. Por ejemplo, la ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (CsCl) a altas velocidades de centrifugación, ha sido usada durante mucho tiempo para la purificación de plásmidos. Más frecuentemente, el uso de la centrifugación se combina con otros métodos como por ejemplo:

- La cromatografía en columnas de centrifugación, que combina la filtración en gel y la centrifugación para purificar el ADN o el ARN de pequeños contaminantes (sales, nucleótidos), así como para el intercambio de tampón o para la selección por tamaños.
- Algunos procesos combinan la adsorción selectiva en una matriz cromatográfica, con la elución por centrifugación para la purificación selectiva de un tipo de ácido nucleico.

1.1.2.2.4 Electroforesis

Los ácidos nucleicos se pueden separar electroforéticamente de acuerdo a su tamaño. Para ello, lo más común es el hacerlo en geles de agarosa o de poliacrilamida. Para poder visualizarlos, se usa la presencia de bromuro de etidio, un agente intercalante de los ácidos nucleicos, que al unirse a ellos y exponerse a luz ultravioleta, emite fluorescencia permitiendo su visualización. Esta separación se usa frecuentemente para determinar de forma rápida el tamaño y la pureza del ADN, por ejemplo, tras la amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

1.1.2.3 Separación magnética (purificación por afinidad)

Cuando hablamos de un elemento utilizando el término magnético, nos estamos refiriendo a que este obtiene un momento magnético cuando se sitúa bajo la influencia de un campo magnético. Lo que esto significa es que, partículas que tengan esta característica, van a poder ser recuperadas de un medio si se aplica un campo magnético, como por ejemplo un imán. Se trata de un método rápido, simple y eficiente de recuperar las partículas después de la unión del ácido nucleico o tras el paso de elución. En este caso, la purificación se basa en la unión por afinidad de los ácidos nucleicos a la superficie de nanopartículas magnéticas (unión selectiva a las partículas magnéticas), normalmente recubiertas en su superficie con sílice. Mediante el uso de un imán, se pueden retener estas partículas con los ácidos nucleicos unidos durante los distintos pasos de lavado, para finalmente liberarlos en condiciones de baja salinidad y que puedan ser recuperados. Podríamos decir que se trata de una técnica en fase sólida que simplifica la purificación ya que, con un simple paso de separación magnética, se pueden remplazar los múltiples pasos de centrifugación, extracciones con solventes orgánicos y los pasos de separación de fases de los métodos convencionales. Además, ofrece la ventaja de la fácil automatización del proceso, minimizando los riesgos de contaminación y degradación habituales en los métodos manuales.

1.1.3 Nanopartículas superparamagnéticas

Debido a sus fuertes propiedades magnéticas y baja toxicidad, la aplicación de las nanopartículas en biotecnología y en medicina ha ido ganando interés. Se sabe que, las partículas magnéticas por debajo de aproximadamente 30 nm, van a tener la propiedad del superparamagnetismo. En este punto, podríamos decir que estas partículas no son realmente magnéticas, si no superparamagnéticas. Lo que esto significa es que solamente van a presentar magnetismo cuando sean sometidas a un campo magnético, como el generado por un imán (21). Esta propiedad permite que las partículas puedan estar de forma dispersa en solución, sin la formación de agregados magnéticos (22-24). De este modo, se previene la formación de aglomerados y se consigue la fácil dispersión de las partículas. Por otro lado, esto nos va a permitir una respuesta muy rápida de las partículas magnéticas frente a un campo magnético, pudiendo ser adsorbidas de una suspensión en cuestión de segundos (<10 seg), y dejando un sobrenadante claro que puede ser fácilmente retirado. Un ejemplo de esta separación aplicada a la extracción y purificación de ADN se muestra en la Figura 1. Pero el uso de partículas magnéticas nos presenta más ventajas a la hora de aplicarlas en bioseparación, ya que pueden ser utilizadas con muestras de un amplio rango de volúmenes (25-29). Esto nos permite solventar ciertos problemas, como el tener muestras con un volumen limitado, o el ser capaces de concentrar los analitos presentes en baja cantidad a partir de grandes volúmenes de muestra. Al mismo tiempo, nos permite eliminar los contaminantes e inhibidores que

puedan estar presentes. Además, estos procesos basados en el magnetismo también tienen la ventaja de ser aptos para la automatización, lo que va a permitir minimizar la manipulación y el tiempo empleado en todo el proceso, proporcionándonos así una mayor reproducibilidad de los resultados y su uso análisis a gran escala.

Una de las principales biomoléculas que es susceptible de ser analizada es el ADN (y ácidos nucleicos en general). Ya sea en el estudio o el diagnóstico de microorganismo, o bien en la genética, una de las principales necesidades es la obtención de los ácidos nucleicos con la mayor cantidad y la mejor calidad posible. Esto debe lograrse a partir de múltiples y complejas muestras, muchas de ellas compuestas por gran cantidad de elementos, los cuales deben ser eliminados para poder realizar los procesos posteriores. El ADN es una molécula polianiónica debido a la presencia de grupos fosfato, por lo que puede ser capturada por superficies con grupos cargados positivamente (30, 31). El uso de nuevas estrategias para la recuperación de los ácidos nucleicos surge para sustituir a los largos y complicados métodos tradicionales, basados en el uso de fenol/cloroformo, pasando al uso de técnicas basadas en la adsorción para llevar a cabo la purificación del ADN/ARN. Entre los soportes más usados para conseguir esta adsorción nos encontramos partículas basadas en sílice (32, 33), fibras de vidrio (34), soportes de intercambio iónico (35-37) y partículas magnéticas modificadas (38-41).

Para realizar esta separación se necesitan materiales que tengan una elevada área superficial, ya que de este modo se consiguen partículas con una elevada capacidad de unión. Así, nos vamos a encontrar principalmente con partículas esféricas (15). Las más comunes son las partículas de magnetita /óxido de hierro (Fe_3O_4), pero aunque estas partículas desnudas tienen la capacidad de unirse al ADN, su área total disponible para la adsorción se va a ver reducida debido a la formación de agregados debido a las fuerzas de atracción entre las partículas (15). Por eso, la estrategia que se lleva a cabo se basa en la modificación de la superficie con polímeros de distinta naturaleza o con grupos reactivos, con el fin de minimizar las interacciones entre partículas y favorecer la unión al ADN. Por ejemplo, el cubrir estas partículas con una capa de sílice las hace biocompatibles, reduciendo su toxicidad y evitando su degradación. Además, esta cubierta va a permitir la adsorción de los ácidos nucleicos de forma directa o por el anclaje en su superficie de grupos reactivos específicos. Otras estrategias incluyen la modificación de la partícula usando distintas sustancias portadoras de grupos reactivos como pueden ser el polietilén glicol (PEG) (42), compuestos amino silano (43), alkoxisilanos (44, 45) o polietilénamina (46, 47).

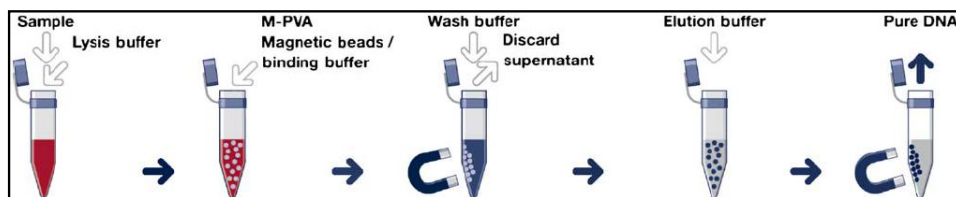


Figura 1: Esquema de la extracción de ácidos nucleicos usando partículas magnéticas para su recuperación usando un imán (15).

1.1.4 Automatización de los sistemas de extracción de ácidos nucleicos

Hay muchas desventajas en el uso de los métodos manuales de extracción, entre los que están la gran cantidad de trabajo manual, la necesidad de personal especialmente entrenado para realizar la extracción, rendimiento limitado, y variabilidad interpersonal en la eficacia de la extracción. En este sentido, la aparición de sistemas automáticos para la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas supone una mejora en los test moleculares, ya que van a solventar los problemas que presenta la extracción manual (9). El uso de estas plataformas automáticas de extracción supone una mejora en la capacidad de trabajo en el laboratorio, mostrando resultados al menos igual de buenos que con los métodos manuales, cuando se usan test moleculares para la detección de patógenos a partir de muestras clínicas (48-58). El uso de estas plataformas automáticas supone el cambio de los métodos tradicionales, como la extracción con fenol-cloroformo o los métodos basados en filtros de fibra de vidrio, de difícil automatización y uso con gran número de muestras, por el uso de nanopartículas magnéticas acopladas a un sistema automatizado. El uso de nanopartículas magnéticas nos permite obtener ácidos nucleicos de mayor pureza con una recuperación más constante que con el uso de filtros de fibra de vidrio, ya que el movimiento de las partículas en los reactivos de extracción de ácidos nucleicos permite una mayor eficiencia en la unión, lavados y elución. Además, no están sujetas a la posible obstrucción de los filtros, y no requieren procesos de filtración a vacío ni centrifugación, haciendo muy fácil la puesta en marcha de la automatización. Pero además de estas facilidades, el uso de las partículas magnéticas permite la recuperación de los ácidos nucleicos en un pequeño volumen de elución con una concentración relativamente alta, lo que es ideal para posteriores aplicaciones (59).

La implementación de estos sistemas implica el uso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro con una composición superficial apropiada, de forma que puedan ser usadas en numerosas aplicaciones como mejora en el contraste de imágenes de resonancia magnética, reparación tisular, inmunoensayos, detoxificación de fluidos biológicos, hipertermia, transporte de fármacos y separación celular (60-69). Y para que puedan ser efectivas en todas estas aplicaciones biomédicas, es necesario que estas nanopartículas tengan altos valores de magnetización, tamaño inferior a 100 nm y una estrecha distribución de tamaños. Pero también es importante la necesidad de

cubiertas de superficie especiales, que tienen que ser no tóxicas y biocompatibles, además de permitir una distribución dirigida de partículas en un área específica. De este modo, las partículas magnéticas se pueden unir a fármacos, proteínas, enzimas, anticuerpos o nucleótidos, y pueden ser dirigidas a un órgano, tejido o un tumor usando un campo magnético externo (70). O también pueden ser recuperadas de un medio complejo unidas a una biomolécula de interés, como por ejemplo los ácidos nucleicos.

Para ello es crucial la estabilización de las partículas de óxido de hierro, pudiendo así obtener ferrofluidos coloidales magnéticos que sean estables frente la agregación, tanto en medios biológicos como bajo la acción de un campo magnético.

El poder usar estas partículas para la separación magnética de ácidos nucleicos presenta múltiples ventajas en comparación con el uso de otras técnicas (15):

1. Los ácidos nucleicos pueden ser aislados directamente a partir de la muestra directa sin procesar como pueden ser sangre, tejidos, medios de cultivo, agua, etc.
2. Las partículas son usadas en procesos en bloque, donde no hay grandes restricciones respecto a los volúmenes de muestra.
3. Las partículas magnéticas pueden ser retiradas de un modo relativamente fácil y selectivo, incluso a partir de suspensiones viscosas.
4. La eficiencia de la separación magnética esta especialmente adaptada para la extracción a gran escala.
5. Esta separación sirve como base para diversos procesos automáticos de bajo y elevado flujo de trabajo, lo que permite el ahorro de tiempo y dinero.
6. Se evita el riesgo de contaminación cruzada de los métodos tradicionales.

1.2 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

El control del tamaño monodisperso es muy importante, ya que las propiedades de las nanoestructuras (nanocristales) van a depender fuertemente de la dimensión de las nanopartículas.

La síntesis de nanopartículas magnéticas puede ser llevada a cabo por múltiples procesos, como se indicará a continuación. Pero la síntesis de nanopartículas superparamagnéticas es un proceso complejo debido a su naturaleza coloidal (71). Por eso hay varios retos a conseguir en esa síntesis. Por un lado, conseguir definir unas condiciones experimentales que lleven a conseguir una población monodispersa de partículas con un tamaño adecuado; y por otro lado, conseguir un proceso reproducible que pueda ser industrializado, sin la necesidad de ningún proceso complejo de purificación como pueden ser la ultracentrifugación (72), la cromatografía de exclusión por tamaños (73) o la filtración magnética (67).

1.2.1 Coprecipitación

La coprecipitación química de sales de hierro es la técnica más comúnmente utilizada para la síntesis de nanopartículas de magnetita (74-78). Los óxidos de hierro, tanto Fe_3O_4 como $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, normalmente son preparados por el envejecimiento de una mezcla estequiométrica de sales ferrosas y férricas en medio acuoso.

La completa precipitación de Fe_3O_4 sucede a un pH entre 8 y 14, con una relación 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$), y en un ambiente de no oxidación por oxígeno (79). Esta reacción de formación de magnetita se muestra en la Fórmula 1.



Fórmula 1: Reacción de formación de magnetita por precipitación de sales de hierro (71).

Pero la magnetita Fe_3O_4 no es muy estable y es sensible a la oxidación, transformándose en maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) en presencia de oxígeno. Aunque también están implicadas en esta transformación varias transferencias de electrones o iones dependiendo del pH de la suspensión. Esta transformación está representada en la Fórmula 2.



Fórmula 2: Reacción de formación de maghemita por oxidación de la magnetita (71).

La principal ventaja que tiene el método de la coprecipitación es que permite la síntesis de gran cantidad de nanopartículas. Pero la contrapartida es que el control de la distribución de tamaño de partículas es limitado, ya que los únicos factores que controlan el crecimiento de los cristales son factores cinéticos. La coprecipitación implica dos pasos (80-84). Por un lado, se lleva a cabo una pequeña explosión de nucleación cuando las concentraciones de las especies alcanzan una supersaturación crítica. Y es entonces cuando se da un crecimiento lento de los núcleos por difusión de los solutos a la superficie del cristal. Para que se produzcan nanopartículas de óxido de hierro monodispersas, estas dos fases deben estar perfectamente separadas (85). Para ello, el control del tamaño de partículas monodispersas se debe llevar a cabo, normalmente, durante la etapa más temprana de la nucleación. Esto es así porque el número final de partículas viene determinado por el final de la nucleación, y no va a cambiar durante la fase de crecimiento. Además, una gran variedad de factores se pueden ajustar en la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro para controlar el tamaño, características magnéticas o propiedades de superficie (86-89). El tamaño y la forma de las nanopartículas puede ser controlado con cierto éxito ajustando el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la naturaleza de las sales (percloratos, sulfatos, nitratos) o la relación de concentración $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

1.2.2 Reacciones en medios restringidos

La idea de este método es el de usar nanoreactores sintéticos y biológicos para poder crear nanopartículas de óxido de hierro de tamaño bien definido. Esos medios restringidos incluyen surfactantes anfotéricos para crear estructuras micelares reversas, que formarán vesículas con nanopartículas de óxido de hierro, sirviendo así de soporte sólido para su formación (90, 91). Estas moléculas surfactantes pueden generar de forma espontánea nanogotas de diferentes tamaños, micelas (1-10 nm) o emulsiones agua-aceite (10-100 nm) (92). En estas nanogotas, las soluciones acuosas de sales de hierro son encapsuladas por una cubierta de surfactante, lo que las separa de la solución orgánica circundante. Lo que implica esto es que, con este sistema, se pueden imponer restricciones cinéticas y termodinámicas en el proceso de formación de las partículas. Estos nanoreactores estabilizados por los surfactantes proporcionan un confinamiento que limita la nucleación y el crecimiento de la partícula. Por eso, la principal ventaja de este método es la variedad de nanopartículas que se pueden obtener, conseguidas variando la naturaleza y cantidad de surfactante y cosurfactante, la fase oleosa o las condiciones de reacción.

1.2.3 Reacciones hidrotermales y de alta temperatura

Para la síntesis hidrotermal de nanopartículas de óxido de hierro, las reacciones se llevan a cabo en medios acuosos en reactores o autoclaves, donde la presión puede ser superior a 2000 psi y la temperatura puede estar por encima de 200 °C. Existen dos vías para la formación de ferritas por medio de condiciones hidrotermales: hidrólisis y oxidación o neutralización de mezcla de hidróxidos metálicos (93).

Se ve que, en estos procesos, el tamaño de partícula de magnetita se incrementa con tiempos prolongados de reacción, y que un mayor contenido en agua resulta en la precipitación de partículas de magnetita más grandes. En el proceso hidrotermal, el tamaño de partícula en cristalización se controla, principalmente, mediante la proporción entre los procesos de nucleación y crecimiento, ya que ambos compiten por las especies (94).

La descomposición por alta temperatura se lleva a cabo a partir de precursores orgánicos de hierro ($\text{Fe}(\text{Cup})_3$, $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ó $\text{Fe}(\text{acac})_3$) usando solventes orgánicos y surfactantes (95). Este método permite obtener nanopartículas con un alto nivel de monodispersión y de control de tamaño. El tamaño y la morfología de las nanopartículas pueden ser regulados mediante el control de los tiempos de reacción y la temperatura, pero también por la concentración y proporciones de los reactivos, naturaleza del solvente, precursores o fuerzas de los complejos.

1.2.4 Reacciones sol-gel

Este proceso se basa en la hidroxilación y condensación de precursores moleculares en solución, originando un “sol” de partículas nanométricas. La posterior condensación y polimerización inorgánica llevan a la formación de una red tridimensional del óxido de metal denominada “gel húmedo” (96-98). Debido a que estas reacciones se realizan a temperatura ambiente, se hace necesario un tratamiento térmico final para alcanzar un estado cristalino. Los principales parámetros que influyen la cinética, las reacciones de crecimiento, la hidrólisis, las reacciones de condensación, y por tanto, la estructura y propiedades del gel, son: el solvente, la temperatura, la concentración de los precursores salinos utilizados, el pH y la agitación (99-101). La principal ventaja que ofrece este método es que se puede controlar adecuadamente tanto la estructura de las nanopartículas como sus tamaños.

El procedimiento sintético puede optimizarse fácilmente mediante la incorporación de surfactantes a la fase de la disolución. De esta forma se pueden controlar las etapas de nucleación y crecimiento cristalino, además de evitar la agregación de las partículas insolubles, dando como resultado una dispersión de nanopartículas estabilizada. Sin embargo, el uso de surfactantes puede modificar la morfología y la carga superficial de dichas nanopartículas, a pesar de que la estructura cristalina no se vea afectada (102).

1.2.5 Métodos poliol

Los procesos poliol (103) son una aproximación química para la síntesis de nano y micropartículas con formas bien definidas y tamaños controlados (104-106). Los solventes como los polioles (ej, polietilenglicol) actúan como solventes capaces de disolver compuestos inorgánicos, además de ofrecer un amplio rango operativo de temperatura (desde 25 °C hasta el punto de ebullición) a la hora de preparar compuestos inorgánicos (107). Además, son muy útiles como agentes reductores, así como estabilizadores para controlar el crecimiento de las partículas y prevenir la agregación.

En este método, un compuesto precursor se suspende en un líquido poliol. La suspensión es movida y calentada a una cierta temperatura, que puede alcanzar el punto de ebullición del poliol. Durante esta reacción, el metal precursor se solubiliza en el diol, forma un intermedio, y entonces es reducido para formar núcleos metálicos que resultarán en partículas metálicas.

1.2.6 Síntesis por inyección en flujo

Esta técnica consiste en la mezcla continua o segmentada de reactivos bajo un régimen de flujo laminar en un reactor capilar. Algunas ventajas que presenta son su alta reproducibilidad, una gran homogeneidad de mezcla y la posibilidad de un control externo preciso del proceso (108).

1.2.7 Métodos electroquímicos

La metodología consiste en la producción de iones en disolución, mediante la oxidación a corriente o potencial controlado, de una lámina del mismo metal del que se quieren generar los iones metálicos. Este método se puede considerar como un método de coprecipitación controlado, debido a que la cantidad de iones que se producen en la disolución se generan durante el tiempo de aplicación de la corriente. El producto final es obtenido por reducción de los hidróxidos formados. Con este método, se consigue un control sobre el tamaño de las partículas mediante variaciones en la densidad de corriente (109, 110).

1.2.8 Métodos aerosol/ vapor

Las tecnologías en aerosol, como son la pirolisis en spray y en laser, son interesantes porque son procesos químicos continuos, lo que permite una alta tasa de producción. En la pirolisis por spray, una solución de sales férricas y un agente reductor conjuntamente en un solvente orgánico se pulveriza en una serie de reactores donde el soluto del aerosol se condensa y el solvente se evapora (111). El residuo seco resultante consiste en partículas cuyo tamaño depende del tamaño inicial de las gotas originales. La pirolisis por laser se puede usar para reducir el volumen de reacción. El láser calienta una mezcla gaseosa de precursor de hierro y una mezcla de gas, produciendo pequeñas nanopartículas de estrecho tamaño y no agregadas.

1.2.9 Sonolisis

El óxido de hierro se puede preparar mediante la descomposición (por termolisis o sonolisis) de precursores organometálicos, y utilizando polímeros o agentes orgánicos de terminación para limitar el crecimiento de las nanopartículas (112-114). Las correspondientes nanopartículas se obtienen irradiando la disolución con ultrasonidos de alta intensidad, bajo una atmósfera de argón y temperatura ambiente durante al menos 3 h. La temperatura tan elevada, generada por el rápido colapso de las cavidades formadas por sonicación, permite la conversión de sales ferrosas en nanopartículas magnéticas. El control sobre el tamaño de las partículas se puede conseguir cambiando el precursor utilizado o variando la temperatura.

1.3 ESTABILIZACIÓN DE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

La estabilización de partículas de óxido de hierro es crucial para obtener ferrofluidos magnéticos coloidales que sean estables contra la agregación, tanto en medios biológicos como bajo la actuación de un campo magnético. Además, va a impedir la aparición de cambios en su estructura original, que llevarían a la alteración de sus propiedades magnéticas, y evitando también su rápida biodegradación con la exposición a medios

biológicos. La estabilidad de una suspensión magnética coloidal viene dada como resultado del equilibrio entre fuerzas de atracción y de repulsión. En teoría, cuatro tipos de fuerzas pueden contribuir al potencial interpartícula en el sistema. Por un lado, nos encontramos con las fuerzas de van der Waals, que inducen atracciones isotrópicas fuertes de corta distancia. Aparecen también las fuerzas electroestáticas de repulsión. La descripción teórica entre estas dos fuerzas se conoce como la teoría Derjaguin- Landau-Verwey- Overbeek (DLVO) (115, 116). Cuando tratamos con suspensiones magnéticas, se añaden las fuerzas magnéticas dipolares entre dos partículas. Estas fuerzas inducen interacciones anisotrópicas que parecen ser globalmente atractivas. Y finalmente, tenemos las fuerzas estéricas de repulsión, que se deben tener en cuenta para partículas no desnudas (117).

Teniendo esto en cuenta, la estabilización de partículas magnéticas se puede conseguir jugando con una o ambas fuerzas de repulsión: electroestática y estérica (118). En la Figura 2 se muestra un ejemplo gráfico de estas dos fuerzas repulsivas.

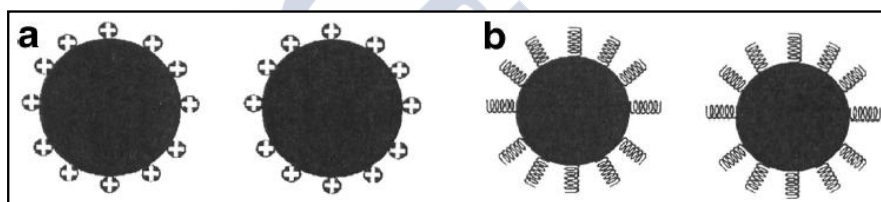


Figura 2: (a) Partículas estabilizadas por la capa electroestática. (b) Partículas estabilizadas por repulsión estérica. (71).

De forma habitual, las nanopartículas de óxido de hierro son cubiertas con macromoléculas como el ácido poliacrílico (PAA) (119), dextrano (120) y polietilenamina (PEI) (121), o bien con cubiertas inorgánicas como sílice (122), carbono (123) o metales preciosos (como oro o plata) (124). Así, vemos que se pueden adoptar distintas estrategias para lograr esta estabilización, basándonos en la naturaleza de las distintas sustancias que se pueden utilizar en la preparación de estas nanopartículas (125).

1.3.1 Estabilizadores monoméricos

Las nanopartículas de óxido de hierro pueden ser cubiertas con distintos materiales como son la sílice (126, 127) o el oro (128, 129). El uso de estas cubiertas no solo proporcionan estabilidad a las nanopartículas en solución, sino que también ayudan a la unión de diversos ligando biológicos a la superficie de la nanopartícula. Estas nanopartículas tienen un núcleo de óxido de hierro con una cubierta metálica externa de materiales inorgánicos.

1.3.1.1 Sílice

La sílice es un material que se ha usado ampliamente como cubierta de nanopartículas magnéticas (130-132). En general, una cubierta inerte de sílice en la superficie de nanopartículas magnéticas previene su agregación en medio líquido, mejora su estabilidad química y proporciona una mejor protección frente a la toxicidad (133). Esta estabilización de las partículas se lleva a cabo de dos formas (134). Por un lado, escudando la interacción del dipolo magnético con la capa de sílice. Por otra parte, las nanopartículas de sílice están cargadas negativamente. De este modo, la cubierta de sílice aumenta la repulsión de coulomb de las nanopartículas magnéticas.

Hay tres métodos que se usan para generar nanoesferas magnéticas de sílice. El primero de los métodos se basa en el método de Stöber (135). Con este método, la sílice se forma *in situ* mediante la hidrólisis y condensación de un precursor sol-gel, como el tetraetoxiortosilicato (TEOS) (136, 137).

El segundo método se basa en la deposición de sílice a partir de una solución ácida silícica (138,139). Algunos estudios defienden que este método parece más eficiente, cubriendo una mayor proporción de la superficie de magnetita que el método TEOS (140).

El tercer método es un método basado en la formación de emulsiones, en el que se utilizan micelas o micelas inversas para confinar y limitar la cubierta de sílice. Este método requiere un gran esfuerzo a la hora de separar la partícula cubierta de la gran cantidad de surfactantes asociados al sistema de emulsión (141,142).

Una de las ventajas que ofrece tener una superficie enriquecida en sílice es la presencia de grupos silanol en superficie, que pueden reaccionar fácilmente con varios agentes de unión para enlazar covalentemente ligandos específicos a esas nanopartículas magnéticas (143, 144). Un ejemplo es la introducción de grupos amino en la superficie de nanopartículas magnéticas cubiertas de sílice mediante la hidrólisis y condensación de un organosilano como el aminopropiltrietoxisilano (APTS ó APS). Este método se conoce como silanización (145-147).

1.3.1.2 Oro

El oro es una cubierta inorgánica muy útil para implementar la funcionalidad, así como para mejorar la estabilidad de las nanopartículas magnéticas en dispersiones acuosas (148). Esto se consigue gracias a dos propiedades principales del oro, que son su estabilidad química y su biocompatibilidad (149). Cuando el oro se usa como cubierta de las nanopartículas magnéticas, esta actúa como una barrera que previene la oxidación del núcleo y la degradación enzimática (150). Además, ésta cubierta exterior va a proporcionar una región de unión para una posterior funcionalización (151).

1.3.2 Polímeros estabilizadores

El uso de estos polímeros se puede llevar a cabo de dos formas. Una de ellas se hace mediante un recubrimiento *in situ*, donde las nanopartículas son cubiertas durante el proceso de síntesis (152). De otro modo, estos polímeros pueden ser usados mediante un recubrimiento post-síntesis, donde el polímero es insertado en las nanopartículas una vez sintetizadas (153, 154).

Existen gran cantidad de estos polímeros usados para recubrir nanopartículas magnéticas. Esto se debe básicamente porque ofrecen, en líneas generales, una buena biocompatibilidad, además de conferir estabilidad a las partículas. Algunos de los principales polímeros usados son (a) el dextrano, biocompatible y con un tamaño de cadenas laterales que favorece interacciones polares óptimas con las superficies de óxido de hierro (155, 156); (b) el polietilen glicol (PEG), que incrementa la biocompatibilidad de las dispersiones de hierro y los tiempos de circulación en sangre (157, 158); (c) el polivinil alcohol (PVA), un polímero biocompatible y que previene la aglomeración de las partículas (159, 160); (d) el ácido poliacrílico (PAA), que incrementa la estabilidad y la biocompatibilidad de las partículas además de ayudar en la bioadhesión (161); (e) así como el alginato, el quitosano, polietilenamina, ácido polimetacrílico y más polímeros descritos en la literatura (162-165).

Otra estrategia para la síntesis de estas nanopartículas es el utilizar polímeros sintéticos preformados como una matriz, para controlar la formación de los núcleos magnéticos (166-168).

1.4 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A METICILINA

Es bien sabido que los estafilococos son colonizadores ubicuos de los epitelios humanos, además de ser patógenos oportunistas implicados en infecciones nosocomiales. Las especies virulentas pueden causar enfermedades severas, que pueden ser fatales (169). De especial interés en este grupo es el *Staphylococcus aureus*, un patógeno oportunista presente como un organismo comensal en la piel y fosas nasales de aproximadamente el 30% de la población normal, siendo capaz de causar un amplio espectro de enfermedades, que incluyen infecciones de la piel y de tejidos blandos (170-172).

Otro punto de interés es la habilidad del *S. aureus* para adaptarse, rápidamente, a la presión selectiva de los tratamientos antibióticos. Esto ha dado como resultado la emergencia y la expansión de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) en el ámbito hospitalario, haciendo más difícil el tratamiento de estas infecciones (173). Esta capacidad de volverse resistente a los tratamientos antibióticos se debe a la presencia del

gen *mecA*, que se localiza en un elemento genético móvil de gran tamaño llamado “Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*” (SCC*mec*), y que es responsable de la resistencia a la metilicina y a otros antibióticos β -lactámicos. El gen *mecA* codifica para una proteína alterada de unión a penicilina (PBP 2a), que tiene muy baja afinidad por todos los antibióticos β -lactámicos. Esto permite que se lleve a cabo la síntesis normal de la capa de peptidoglicano, incluso en la presencia de estos antibióticos (174).

Las infecciones debidas al SARM están descritas desde los años 60, después del comienzo del uso clínico de la metilicina (175, 176). A lo largo de todo este tiempo, numerosas cepas de SARM han emergido y se han expandido por todo el mundo, y el SCC*mec* ha sido adquirido por distintos linajes de *S. aureus* sensible a metilicina (177). Hasta la fecha, se han descubierto tipos de SCC*mec* del I al XI, además de múltiples variantes de estos tipos (177, 178).

Las infecciones asociadas al ámbito hospitalario causadas por SARM (HA-SARM) se han convertido en un tema de importancia para los servicios de salud en todo el mundo, debido a las elevadas tasas de infección, mortalidad y altos costes de tratamiento (173, 179, 180). En algunos países, como USA, los SARM adquiridos en la comunidad (CA-MRSA) se han expandido en los últimos años (181), incrementando la entrada de la infección en los hospitales (182, 183). En Europa, la prevalencia del HA-SARM ha descendido en los últimos años en algunos países, como por ejemplo Austria, Francia, Irlanda, Reino Unido y Grecia, pero en otros países la prevalencia se ha mantenido estable (177, 184). Sin embargo, se indican tasas muy elevadas de HA-SARM en el este de Asia (177).

Con esta situación, la existencia de programas para prevenir la transmisión del SARM que impliquen unas estrategias clave, incluyendo estudios activos de vigilancia, higiene de manos, aislamiento de pacientes y otras actividades para la prevención de la transmisión, podrían ayudar a evitar la transmisión y a disminuir la prevalencia de estas infecciones. Para este propósito, el uso de la PCR a tiempo real para la detección del SARM reduce significativamente el tiempo de detección (unas 2 horas de en el trabajo del laboratorio), comparado con las pruebas basadas en cultivo y pruebas fenotípicas (al menos unas 16 a 24 horas). Esto nos permite mejorar la eficiencia en las estrategias de control y de manejo. La combinación de la información obtenida por los métodos clásicos, junto con las nuevas técnicas moleculares (PCR a tiempo real) y la incorporación de técnicas como la espectrometría de masas (MALDI-TOF), nos va a permitir una mayor capacidad y velocidad de respuesta en el diagnóstico. Esto va a repercutir claramente en la eficacia a la hora de aplicar de los tratamientos, así como en las estrategias de aislamiento para permitir reducir la prevalencia de este tipo de infecciones.

1.5 PCR Y DIAGNÓSTICO

1.5.1 Definición de PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que lleva a cabo la síntesis específica y exponencial de una región predeterminada de ADN. Para ello, se utilizan dos fragmentos de ADN específicamente diseñados (oligonucleótidos, primers o cebadores), los cuales forman los dos extremos de la molécula de ácido nucleico que va a ser amplificada (185). Las reacciones de amplificación mediante PCR son, en general, altamente específicas. Aquí, con especificidad, nos referimos a la correcta hibridación de los primers con las secuencias complementarias presentes en la molécula de ADN diana que va a ser amplificada. Los primers usados en la PCR son secuencias específicas de nucleótidos que están diseñadas para hibridar con la cadena paralela o antiparalela de la molécula de ADN diana. Y como necesitan ser totalmente complementarios a sus secuencias diana, por eso es necesario conocer alguna información de la secuencia de los extremos del ADN, para así poder diseñar los primers. Una vez hibridados con la secuencia diana, los primers proporcionan el extremo 3'-hidroxilo de doble cadena, necesario para que la ADN polimerasa dependiente de ADN empiece la síntesis de una nueva cadena (complementaria a la que se hibridó el primer). Pero como la PCR utiliza dos primers (diseñados para que cada cadena de la molécula de ADN se amplifique), ciclos repetidos de hibridación (*annealing*) y de disociación de primers permiten la amplificación del ADN en la dirección 5' \rightarrow 3' en ambas hebras (186).

1.5.2 Etapas de la PCR

La PCR es un proceso basado en tres pasos (desnaturalización, hibridación y elongación), que se van a repetir de forma cíclica un número determinado de veces (Figura 3). La muestra de ADN es inicialmente desnaturalizada para desenrollar y separar la doble hélice en cadenas independientes. Esto se consigue normalmente calentando la muestra en un medio acuoso generalmente a 94 °C durante 30-90 segundos. La hibridación del primer específico a cada una de las cadenas se logra bajando la temperatura de reacción a la temperatura de hibridación (T_m), que suele encontrarse entre 45-65 °C (dependiendo del diseño de las secuencias de oligonucleótidos usadas como primers), durante unos 30-90 segundos. Después del primer paso de hibridación, la temperatura se eleva hasta aproximadamente 72 °C, una temperatura óptima para la amplificación mediada por la ADN polimerasa, durante un periodo de tiempo puede variar entre los 30-180 segundos. Estos tres pasos completarían un ciclo completo de amplificación, el cual se repetirá un número predeterminado de veces (de 30 a 45 ciclos). Tras cada ciclo de amplificación, cada nueva molécula de ADN de doble cadena sintetizada (conocida como amplicón) contiene secuencias terminales que son complementarias a la secuencia de los primers usados. Esto le permite a cada amplicón

servir como molde para la replicación en las siguientes rondas de ciclos de la PCR, resultando en una amplificación exponencial de la diana duplicando, de forma teórica, la cantidad de dicha diana en cada ciclo (Figura 4). Esto permite llegar a obtener un número elevado de copias de la secuencia deseada a partir de unas pocas moléculas de origen (187, 188).

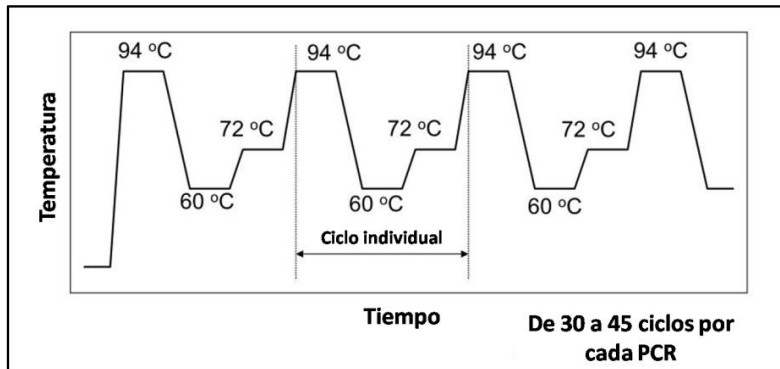


Figura 3: Perfil de temperaturas de un ciclo típico de una reacción de PCR.

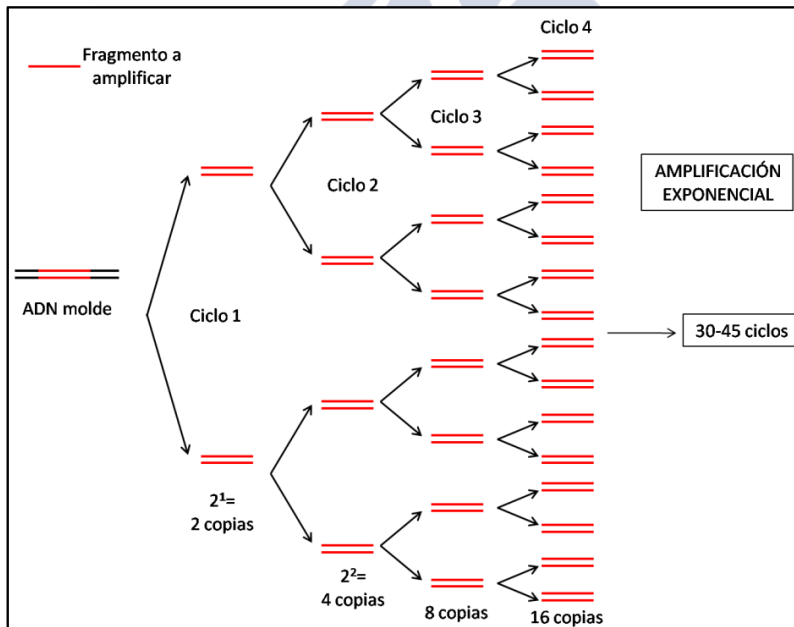


Figura 4: Esquema de la amplificación exponencial a la que se somete la diana de ADN en cada ciclo de amplificación por PCR.

1.5.3 Parámetros de la PCR

Hay gran cantidad de protocolos estándar con los que se pueden obtener resultados satisfactorios. Pero algunas veces es necesario, e incluso recomendable, determinar las condiciones más adecuadas para cada experimento en particular para evitar, por ejemplo, obtener un bajo rendimiento y poca especificidad en la reacción. Esto se debe a que en la PCR podemos modificar los valores de diversas variables, cambios que van a acabar influyendo en el resultado final. Y aunque existan valores estándar para estas variables, la mejor forma de determinarlas es de forma empírica. Los principales parámetros que pueden influir en el desarrollo de la reacción de amplificación son (189):

1. Temperatura y tiempo de duración de cada paso

De forma general, las temperaturas de desnaturalización y elongación suelen coincidir en distintas PCRs, variando el tiempo de duración en función del tamaño del fragmento a amplificar. La temperatura que suele variar es la de hibridación (entre primers y molde de DNA), que se calcula en función de la T_m (Temperatura de Melting, o de fusión). Esta es la temperatura a la que el 50% de la molécula de DNA está desnaturalizada. La T_m está relacionada con el tamaño de la molécula y su contenido relativo en pares de bases $C \equiv G$ o $A = T$, y teniendo esto en cuenta, la obtenemos de esta forma: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. En general, la temperatura de hibridación se suele fijar en unos 2-5 °C por debajo de la T_m . Temperaturas más altas o más bajas de lo normal en cualquiera de los pasos llevarán a malos resultados en la reacción.

2. Número de ciclos

La elección de un mayor o menor número de repeticiones de las tres etapas de la reacción nos llevará, al final, a una mayor o menor cantidad del amplificado de interés.

3. Concentración de distintos componentes

- a) Ácidos nucleicos: la cantidad necesaria para cada reacción puede oscilar entre los 10 fg y los 10 µg de ADN extraído o de ARN retrotranscrito.
- b) Polimerasa: entre 0.2-2 unidades de Taq polimerasa, que es la más usada habitualmente. Existen otras DNA polimerasas que se pueden usar, pero es importante tener en cuenta las características propias de cada una.
- c) Primers o cebadores: ente 0,1-1 µM de cada uno de los primers, complementario cada uno a una de las cadenas molde del ADN.
- d) Deoxiribonucleótidos trifosfato (DNTPs): se añaden a una concentración de aproximadamente 200 µM para cada uno de ellos (adenosina, citosina, guanosina y timidana trifosfato).
- e) Iones.- el Mg^{2+} es de los más importantes. Suele aportarse como $MgCl_2$, y actúa como cofactor de la DNA polimerasa. Suele añadirse en concentraciones que están entre 0.5-5 mM, y que van a permitir variar la eficacia y especificidad de la reacción. De forma general, concentraciones bajas conllevan rendimientos bajos, mientras que un

exceso de magnesio resulta en una acumulación de productos inespecíficos. Su concentración libre depende de las concentraciones de compuestos que se unen a él como los dNTPs, pirofosfato libre (PPi) y EDTA. Por eso, lo mejor es calcular empíricamente las concentraciones óptimas de cada reacción.

4. Composición del buffer

La PCR requiere un tampón a pH 8.3-8.9, con 30-50 mM de K^+ y agentes estabilizantes de la DNA Polimerasa, como gelatina, seroalbúmina bovina o detergentes no iónicos.

5. Calidad del molde

Que la muestra no esté dañada y que tenga un tamaño suficiente para incluir nuestra diana, van a permitir que la reacción se realice adecuadamente

6. Elección de los primers o cebadores

Deben ser complementarios a los extremos de la región que nos interese amplificar, así como evitar que sean parecidos entre sí para evitar la formación de dímeros de primers. Además, en la elección de los cebadores nos interesa su tamaño. Cuanto más pequeños sean, menos específicos serán para nuestra zona de interés. De este modo, nos interesan primers que sean lo suficientemente grandes como para que muestren especificidad sólo por nuestra zona de interés, pero tampoco que sean excesivamente grandes, ya que implicaría la necesidad de conocer zonas flanqueantes mayores. Por lo general, primers con 17-18 nucleótidos (nt) suelen ser bastante específicos, aunque se usan tamaños que van hasta los 30 nt. Suelen tener un mínimo de 12 nt hasta un máximo de 80 nt. Otro dato que nos interesa tener en cuenta es la temperatura de hibridación en la que primers y muestra se unirán. Temperaturas de hibridación muy altas no permitirán la formación de puentes de hidrógeno entre los primers y el molde, es decir, no habrá hibridación (y por tanto no habrá producto de amplificación). Temperaturas muy bajas pueden provocar hibridaciones inespecíficas en otras regiones del molde que no sean totalmente complementarias, debido al estado de mayor relajación que implica esa baja temperatura. Esto va a depender de la proporción de entre los distintos nucleótidos que formen la secuencia del cebador. A mayor proporción de guanosina y citosina, mayor será la temperatura necesaria.

Además de estas variables, hay otros factores que pueden provocar que la reacción no se lleve a cabo o que dé lugar a errores:

- Contaminación: que cualquiera de los componentes de la reacción se contamine, ya sea con DNA exógeno que interfiera en la reacción, así como sustancias capaces de parar la reacción.
- Amplificación inespecífica: amplificación de una región diana distinta dentro del genoma diana (por ejemplo, del mismo microorganismo), o de una región presente en otro genoma distinto (por ejemplo, otro microorganismo distinto al que se quiere detectar). Resulta de un mal diseño de los primers específicos para la amplificación, así como por un perfil de temperaturas inadecuado en la hibridación.

1.5.4 Variantes de la PCR convencional

Una clasificación rápida que se puede hacer de la PCR es en base al tipo de ácido nucleico que se usa como molde para la amplificación. Tradicionalmente, la PCR convencional era una técnica que permitía la amplificación del ADN mediante el uso de una ADN polimerasa ADN dependiente. Pero a medida que se fue conociendo más sobre los mecanismos de síntesis y replicación de ácidos nucleicos, y con el descubrimiento de las ADN polimerasas dependientes de ARN, se pudo llevar a cabo la amplificación del material genético de muchos otros microorganismos. Como ejemplo, destacar una gran cantidad de virus con importancia clínica (Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis C (VHC), gripe, sarampión, Virus de la Hepatitis A (VHA). Además, permitió también el análisis de los ARN implicados en las distintas rutas metabólicas, por ejemplo, en células eucariotas. Esta variante de PCR se conoce como PCR reversa o PCR de retrotranscripción (RT-PCR), ya que implica un primer paso de retrotranscripción para poder generar el ADN complementario (ADNc) de la molécula de ARN de partida.

En base a esto, nos encontramos con más variantes de la PCR en función de los primers que se usan, en base al uso de sondas para monitorizar la amplificación o, por ejemplo, en base a la estrategia de temperaturas usadas para conseguir la correcta amplificación de la diana deseada. Algunos de los tipos más usados son (189):

- *multiplex* PCR: se basa en el uso, en la misma mezcla de reacción, de múltiples pares de primers para la amplificación de varias regiones diana distintas al mismo tiempo. El número de pares de primers que se van a poder incluir depende de las condiciones de reacción, pero sobre todo, de la ausencia de interacciones entre los primers individuales en la mezcla de reacción. Los cebadores usados son ligeramente mayores (23-28 nucleótidos) que los usados en la PCR estándar con una sola diana, y son seleccionados en base a una T_m similar y a un contenido similar de guanosina/ citosina (de al menos el 40%).
- PCR reversa (PCR de retrotranscripción): se basa en la formación de ADNc a partir de ARN para poder llevar a cabo su amplificación y análisis. Se usa, por ejemplo, en la detección y análisis de muchos virus (VIH, VHC).
- PCR con primers degenerados: los primers degenerados son una mezcla de oligonucleótidos donde el núcleo de la secuencia es idéntica en todos. Pero una o más de las secuencias de los primers contiene cambios en uno o más nucleótidos, en comparación con el resto de primers presentes en la mezcla. Estas mezclas se diseñan para amplificar la misma secuencia diana de ADN, pero en la que se esperan pequeños cambios nucleotídicos entre diferentes aislados o individuos.

- PCR a tiempo real (cuantitativa o no): se basa en el uso de moléculas fluorescentes que se van a unir al ADN, permitiendo detectar la amplificación en cada ciclo a lo largo de toda la reacción.
- *Hot start* PCR: se basa en el uso de nuevas DNA polimerasas termoestables, las cuales requieren un mayor periodo de tratamiento a altas temperaturas (por ejemplo $95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 8$ minutos) para ser activadas. Esto permite preparar la mezcla de reacción al completo sin el riesgo de la hibridación inespecífica de los primers, ya que la polimerasa no estará activa hasta que la temperatura esté por encima de la temperatura de hibridación. Esto permite generar mayor cantidad de amplicones específicos, así como ser menos sensible a la acción de inhibidores de la PCR.
- *touchdown* PCR y *touch-up* PCR: se trata de reacciones en las que la temperatura de hibridación, en una primera parte de la PCR, va aumentando o disminuyendo (respectivamente) hasta llegar a la T_m óptima de los primers. El objetivo de estas estrategias es la de aumentar la especificidad de la reacción.

1.5.5 Análisis de los productos de amplificación de la PCR

El análisis de los productos de amplificación de la PCR (amplímeros o amplicones) es un paso esencial a la hora de poder determinar tanto la calidad (por ejemplo, la presencia o ausencia de amplicones no específicos), como la cantidad (en valores relativos o exactos) del ácido nucleico diana que ha sido amplificado. Esta detección y análisis se va a poder llevar a cabo tras el proceso de amplificación, fuera de los tubos donde se llevó a cabo la PCR (análisis en geles de electroforesis), o bien se puede llevar a cabo en el mismo tubo de reacción durante el propio proceso de reacción (PCR a tiempo real). Esta detección a tiempo real se comentará en el punto siguiente.

1.5.5.1 Análisis mediante electroforesis en gel

El método más usado comúnmente para establecer la calidad y cantidad de los productos de PCR, tras finalizar la reacción, es la electroforesis en gel de agarosa junto con el uso de agentes intercalantes del ADN para llevar a cabo la visualización (190). Los geles de electroforesis consisten en una matriz porosa semisólida sobre la que se va a realizar una separación en base al tamaño. En función de la concentración usada, más densa será la matriz del gel. Para conseguir que nuestras moléculas de ADN se desplacen a lo largo del gel se van a usar dos electrodos, uno a cada extremo del gel, generando una diferencia de cargas entre ambos polos. De este modo, como la carga neta global del ADN es negativa, será atraído hacia el polo donde se generan las cargas positivas (ánodo), al mismo tiempo que las cargas generadas en el polo negativo (cátodo) lo repelen. Así se consigue que las moléculas de ADN atraviesen el gel con una movilidad que va a depender de su tamaño. Aquellas de mayor tamaño tendrán mayor dificultad para atravesar la matriz porosa del gel, y por tanto, se desplazarán más lentamente que aquellas moléculas de menor tamaño, que se moverán más rápidamente a través de la

matriz del gel. De este modo, se produce una migración diferencial de las moléculas de ADN en función a su tamaño, que nos va a permitir separarlas y diferenciarlas. Pero para poder visualizar el ADN en la electroforesis se necesita el uso de agentes intercalantes de unión al ADN, siendo el bromuro de etidio el más usado. Lo que hace es intercalarse entre los pares de bases del ADN a lo largo de toda la molécula. En este estado de unión, cuando es expuesto a luz ultravioleta, emite fluorescencia. Así nos permite la visualización del ADN amplificado en nuestra PCR. Este agente intercalante puede ser añadido directamente al preparar el gel, o bien puede someterse al gel tras la electroforesis a un baño en una solución con bromuro de etidio. De ambos modos, lo que se consigue es “teñir” el ADN para permitir su visualización. Además, en la electroforesis se usan marcadores de peso molecular, formados por fragmentos de ADN de tamaño conocido. De este modo, se puede calcular el tamaño aproximado de los fragmentos de ADN que queremos estudiar. Para llevar a cabo la electroforesis se usan un tampón de electroforesis con el que se cubre el gel y ambos polos, y que es el mismo que se usa para disolver la agarosa a la hora de preparar el gel. El tipo de tampón usado puede afectar a la resolución de la separación del ADN. El tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) suele usarse para obtener una mejor resolución con fragmentos mayores a 4 kilobases (kb). En cambio, el TBE (Tris-Borato-EDTA) se suele usar para obtener una mejor resolución con fragmentos que oscilan entre 0.1-3 kb. También influye en la migración la concentración de agarosa, debido a la densidad de la matriz que se forma al usar mayor o menor cantidad en su preparación. La mayoría de los geles de agarosa utilizados en biología molecular tienen una concentración de agarosa que oscila entre 0.8 y 4 %, siendo los más ampliamente usados los geles con una concentración de 1% y 2%. Estas matrices del 1-2 % permiten la separación de amplicones de PCR con tamaños que van desde los 100 pares de bases hasta las 10 kb. Sin embargo, la naturaleza de las matrices de agarosa no va a permitir la separación de moléculas con un tamaño de, aproximadamente, menos de 15 nucleótidos. Además, como estos geles se vuelven más densos a mayor concentración de agarosa, fragmentos de unos 100 pares de bases tendrán dificultad para atravesar la matriz de geles con concentraciones del 4% o mayores.

Una alternativa al uso de los geles de agarosa, pero usando exactamente la misma base de separación, son los geles de poliacrilamida. Estos se caracterizan por tener un mayor grado de resolución a la hora de separar amplicones de tamaños similares. Usando elevadas concentraciones de acrilamida, se pueden separar pequeños fragmentos de ADN y ARN que se diferencien en tamaño solamente en un nucleótido.

1.5.6 PCR a Tiempo Real

La PCR en Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional (o PCR a punto final) en la que se va a poder monitorizar de forma continua, en cada ciclo, la amplificación. De este modo, nos va a permitir la detección a tiempo real. Así, se puede

eliminar el paso de detección mediante electroforesis, que es necesario para ver la formación de los amplicones en la reacción. Para poder llevar a cabo esta detección a tiempo real se necesita del uso de unas moléculas, los fluoróforos, que emitirán fluorescencia durante la reacción. Además, es necesario el uso de termocicladores que llevan incorporados lectores de fluorescencia, con lo que van a poder medir los niveles de esta en cualquier momento de la reacción de amplificación. Esto nos va a permitir medir la cantidad de ADN sintetizado en cada ciclo, ya que la emisión de fluorescencia es proporcional al ADN formado durante la reacción. Así, el sistema puede detectar y registrar en todo momento la cinética de la reacción (191).

Una de las principales ventajas que presenta la PCR a tiempo real es su mayor sensibilidad. Además, la cuantificación de la reacción no se hace en función del producto final (PCR convencional), ya que las variaciones que se pueden encontrar, debido a la propia naturaleza enzimática de la reacción, pueden ser muy significativas. Por eso, en la PCR a tiempo real esta cuantificación se realiza en función del denominado ciclo umbral (Threshold Cycle o Ct). Este se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa superior al ruido de fondo (background). Por tanto, como este Ct se sitúa al inicio de la reacción, no se va a ver afectado por las variaciones propias de la misma. En la Figura 5 vemos un ejemplo que explica esto, donde vemos muestras con cantidad igual de ADN de partida con el mismo valor de Ct, pero con variaciones en la cantidad total de amplificado al final de la reacción (punto final de la curva) (192).

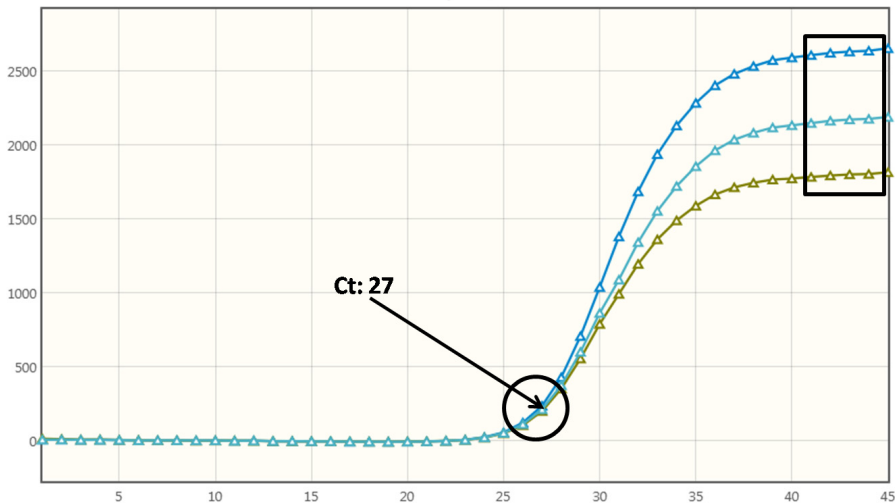


Figura 5: Ejemplo de la amplificación de tres réplicas de la misma muestra donde se ve el mismo valor de Ct, indicando el inicio de la amplificación, pero con un resultado final de la curva de amplificación diferente.

Las principales propiedades de este parámetro son:

- Como ya se indicó, nos va a determinar el ciclo inicial de amplificación,

- Nos permite separar los datos del ruido de fondo,
- Es inversamente proporcional al número de copias inicial de la secuencia de ácido nucleico diana. Es decir, a mayor cantidad inicial de ácido nucleico, más bajo será el valor de Ct y viceversa (Figura 6).
- Se suele establecer como 10 veces el ruido de fondo.

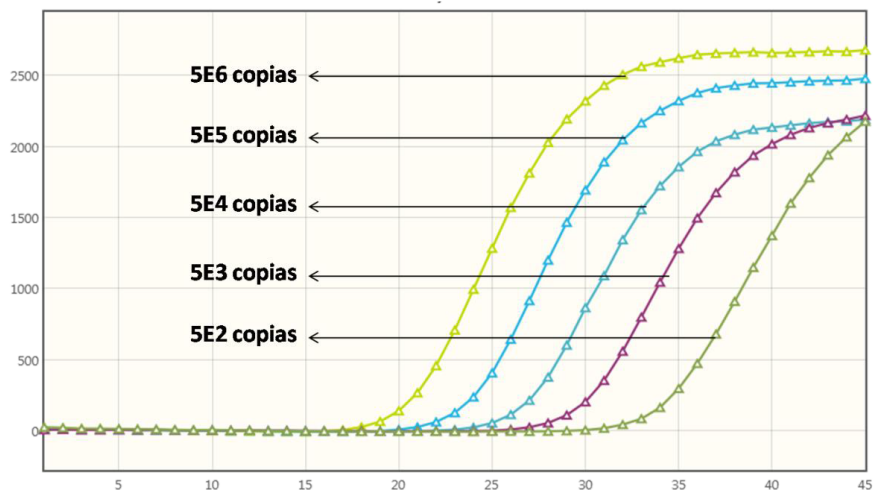


Figura 6: Ejemplo de la amplificación de muestras con cantidad de copias decrecientes conocidas que nos muestra la relación inversamente proporcional entre el valor del Ct y la cantidad de partida de copias en una muestra.

1.5.6.1 Métodos de detección y cuantificación

Como ya comentamos, la detección de la amplificación en la PCR a tiempo real se basa en la emisión y detección de fluorescencia durante la reacción. Así, nos encontramos que los sistemas de detección por fluorescencia empleados pueden ser de dos tipos: mediante el uso de agentes intercalantes y mediante el uso sondas específicas.

Los agentes intercalantes son moléculas con afinidad para unirse al ADN de doble cadena e intercalarse entre sus bases. Estos fluorocromos, además, van a ver aumentada notablemente su emisión de fluorescencia en este estado de unión. Esto nos va a permitir la detección de la amplificación, ya que a medida que aumenten el número de copias, aumentará también la cantidad de fluoróforo unido al ADN, y por tanto, la cantidad de fluorescencia en cada ciclo (193, 194). El más utilizado es el SYBR Green I, que se excita a 497nm y emite a 520nm. La desventaja de usar estos agentes intercalantes es que se trata de un método de detección con una baja especificidad. Esto se debe a que se van unir de forma indiscriminada a cualquier ADN de doble cadena presente en el tubo de reacción, ya sea resultado de una amplificación inespecífica o dímeros de primers, algo muy frecuente en la PCR. Para ayudar a mejorar la especificidad es necesario el uso de unas condiciones de reacción óptimas, así como una selección cuidadosa de los primers para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Una estrategia útil es la de iniciar la

reacción a temperaturas elevadas (hot-start PCR), para disminuir así de forma notable el riesgo de que se den amplificaciones inespecíficas. Además, lo que se hace para determinar si las curvas de amplificación corresponden a productos específicos de amplificación es determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados. Esto se lleva a cabo mediante el análisis de una curva de desnaturalización (“melting curve”) al final de la reacción. Este análisis consiste en calentar la mezcla de reacción lentamente desde 50°C hasta 95°C, monitorizando continuamente la fluorescencia. De este modo, la temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una caída drástica de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I. Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que va a depender sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Gracias a esto, se observarán diferentes picos al representar la derivada de la fluorescencia respecto a la temperatura. Podemos ver un ejemplo de este análisis en la Figura 7. En estas condiciones, el SYBR Green I se puede utilizar para cuantificar e incluso para la detección de mutaciones puntuales (SNPs). Esto se debe a que, hasta los amplicones que difieren en un solo nucleótido, pueden desnaturalizarse a diferentes temperaturas. Esto nos va a permitir detectar sus picos de desnaturalización, pudiendo así, por ejemplo, distinguir muestras homocigotas (un solo pico) de muestras heterocigotas (dos picos) (195).

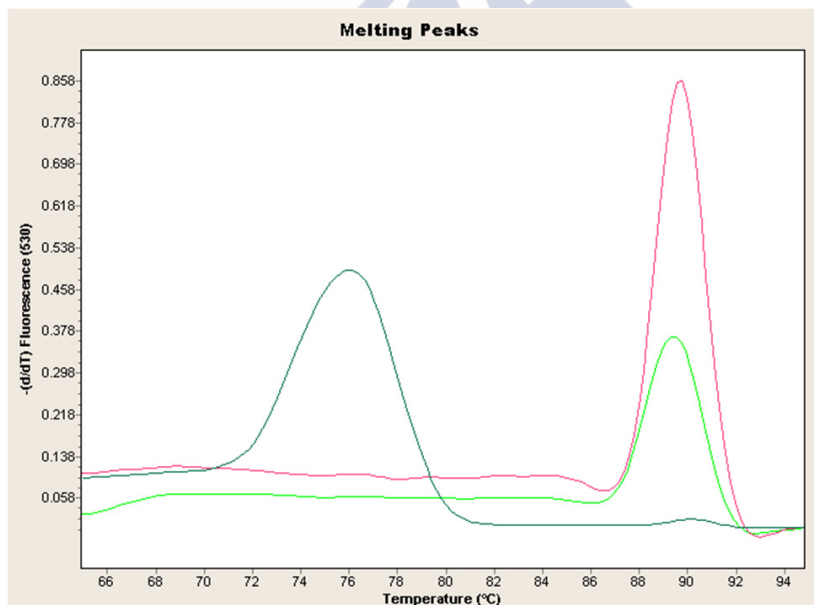


Figura 7: Ejemplo de un análisis de picos de melting de muestras con amplificación positiva para citomegalovirus usando SYBR Green I. A la izquierda, pico de dímeros de primers. A la derecha, picos específicos para la amplificación de citomegalovirus.

Las sondas son oligonucleótidos específicos que se van a unir una zona de la diana de amplificación. Estas van marcadas con dos tipos de fluoróforos, un donador (reporter) y un aceptor (quencher). El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas (196). Este mecanismo de detección se puede dividir en dos clases en función de las sondas, teniendo las sondas de hidrólisis y las sondas de hibridación.

Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos marcados con dos fluoróforos, donador (extremo 5') y aceptor (extremo 3'), que se encuentran próximos mientras la sonda se mantiene íntegra (197). En este estado, la fluorescencia liberada por el donador es absorbida por el aceptor, impidiendo así la detección. Cuando esta hibrida con el ADN molde durante la amplificación, la ADN polimerasa se desplaza a lo largo de la cadena de ADN sintetizando la nueva cadena. Al llegar a la zona donde está la sonda, y gracias a su actividad exonucleasa, la polimerasa hidroliza la misma liberando al fluoróforo donador. De este modo, donador y aceptor ya no están próximos, por lo que la fluorescencia ya no puede ser absorbida por el aceptor, pero sí que es detectada por el fluorímetro del termociclador. Son conocidas como sondas TaqMan. El mecanismo de acción se puede ver en la Figura 8 (198).

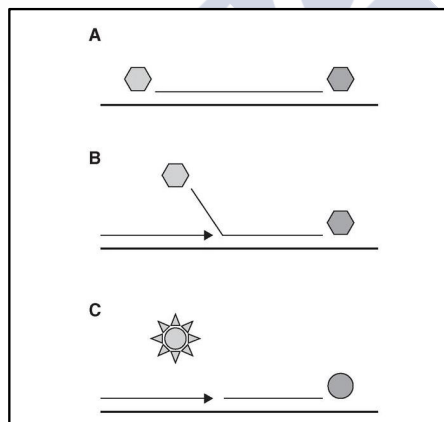


Figura 8: Esquema del funcionamiento de las sondas de hidrólisis usadas en la PCR a tiempo real. Se puede ver la unión de la sonda a la región diana específica (A), la hidrólisis de la misma por la acción de la polimerasa (B), y la emisión de fluorescencia por el fluoróforo una vez separado de la sonda.

Las sondas de hibridación también son oligonucleótidos marcados con fluoróforos en sus extremos (199, 200). Al contrario que en las de hidrólisis, en las sondas de hibridación la emisión y captación de la fluorescencia se lleva a cabo con la unión de la sonda a la secuencia diana. Esto puede pasar de dos formas. Puede suceder por la separación de los fluoróforos, que estaban próximos entre sí con la sonda libre, tras la

unión (sondas molecular beacons, Figura 9 Izquierda) (198). También puede darse debido a la unión de dos sondas independientes, cada una marcada con uno de los fluoróforos, de tal forma que al unirse a la secuencia diana ambos fluoróforos quedaran próximos. En este momento, la fluorescencia emitida por el donador será captada por el receptor, que se excitará y emitirá fluorescencia en otra longitud de onda, que será captada por el termociclador (sondas FRET, Figura 9 Derecha) (199).

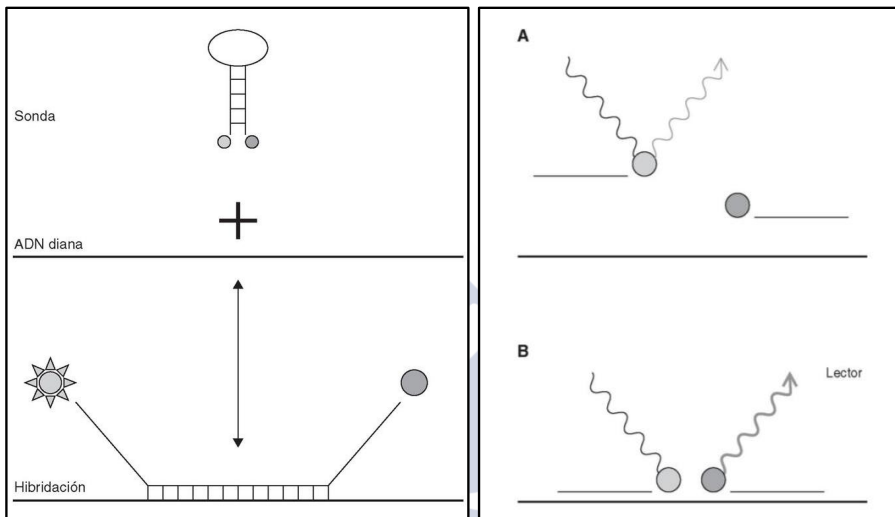


Figura 9: Mecanismo de acción de las sondas de hibridación. Las sondas molecular beacons (izquierda), que tras la unión a la región específica de la diana dejará a los fluoróforos con los que está marcada lo suficientemente separados como para que la fluorescencia emitida por el donador no pueda ser absorbida por el receptor, siendo así detectada por el sistema de PCR. Las sondas FRET (derecha) son dos sondas individuales marcadas, una con un fluoróforo donador y otra con un receptor. Cuando se unen a la región diana, ambos fluoróforos quedarán próximos, de tal forma que el donador de energía excitará al receptor, haciendo que emita fluorescencia en otra longitud de onda que será detectada por el sistema de PCR.

Con el uso de sondas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las mismas, lo que conlleva un aumento en igual proporción de la fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza, además, la especificidad de la detección, ya que mientras no haya unión de la sonda, no habrá amplificación y tampoco fluorescencia. Del mismo modo que con los agentes intercalantes, se pueden hacer análisis de curvas de melting sobre los amplificadores para identificar la correcta amplificación de la diana. Además, gracias a la elevada especificidad que ofrece el uso de las sondas, se puede llevar a cabo amplificaciones de distintas dianas de forma simultánea (PCR múltiple o *multiplex PCR*) en el mismo tubo de PCR, identificando posteriormente a cada amplificado de forma correcta con el análisis de estas curvas. Las sondas de hidrólisis no permiten realizar este tipo de análisis.

Una de las ventajas de la PCR a tiempo real, junto a su rapidez, es que nos va a permitir cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico en nuestra muestra, así como identificar polimorfismos o mutaciones puntuales (201).

1.5.7 Utilidad de la PCR en el diagnóstico microbiológico

Una de las grandes necesidades en el avance del diagnóstico era la necesidad, cada vez mayor, de detectar muy pequeñas cantidades de ciertas moléculas con relevancia clínica, lo que exigía una metodología con una elevada sensibilidad. El poder detectar infecciones virales con baja titulación, mutaciones puntuales en genes o aberraciones genéticas en tumores empezaron a ser posibles con el descubrimiento de la PCR en 1983 por Kary Mullis (202), y por el gran desarrollo posterior que se hizo de la técnica, consiguiendo perfeccionarla y desarrollando distintas variantes. La característica que hace destacar a la PCR reside en el hecho de que, a partir de cantidades extremadamente pequeñas de ADN, se van a poder ser amplificar de forma específica a grandes cantidades de ADN sintético *in vitro*. Esto se consigue mediante la replicación continua, exponencial y semiconservativa que se lleva a cabo de una región diana, bien definida, presente en el ADN molde (189).

Si trasladamos esta capacidad y su uso al campo del diagnóstico microbiológico, nos encontramos con una herramienta increíblemente útil a la hora de mejorar la sensibilidad del diagnóstico (detección de microorganismos que no crecen o no se dan cultivado). También es de gran utilidad al mejorar la capacidad de respuesta para la identificación (unas pocas horas entre extracción de ácidos nucleicos y PCR) respecto al cultivo y pruebas bioquímicas (de 16-24 horas a días de crecimiento en medios de cultivo en función del microorganismo) (203).

El gran desarrollo de esta técnica ha llevado a que, en la actualidad, nos encontremos con múltiples variantes de la misma que van a poder ser usadas en distintos ámbitos del laboratorio, no sólo clínico, en función de las necesidades. Desde la PCR convencional con posterior visualización por electroforesis en geles de agarosa, pasando por la PCR reversa, la PCR múltiple, la PCR de secuenciación o por la PCR a tiempo real, todas nos van a permitir en el laboratorio detectar y analizar los ácidos nucleicos con múltiples fines. Sin restar importancia a las diversas variantes de la PCR, una de las más implantadas en el diagnóstico microbiológico es la PCR a tiempo real. Esta, con sus distintas posibilidades metodológicas, nos permite mejorar el diagnóstico y, en muchos casos, ayudar en el seguimiento de las infecciones así como en la caracterización de los distintos microorganismos en distintos ámbitos (10,203):

- Diagnóstico viral (VIH, gripe, CMV, VHB)
- Diagnóstico bacteriano (tuberculosis, SARM, pneumococo, meningococo)
- Carga viral (seguimiento VIH, VHC)
- Microorganismo con mutaciones de resistencia (SARM, carbapenemasas)

- Parasitología
- Diagnóstico de hongos
- Microorganismos no cultivables o de cultivo de bajo rendimiento
- Caracterización genética (genotipado, estudio de mutaciones de resistencia)

Por todo esto se convierte en una herramienta altamente útil en el ámbito clínico, permitiendo obtener información valiosa que ayudará en situaciones clínicas diversas. Y más concretamente, en el ámbito de la microbiología, podríamos destacar algunos puntos en los que se convierte en una herramienta tremendamente útil (10, 202, 203):

- Diagnóstico

Su principal ventaja aquí es su gran sensibilidad y especificidad diagnóstica si se comparan con técnicas convencionales como la serología y el cultivo. Además, también ofrece una gran rapidez en la obtención de los resultados, ya que nos permite conseguirlos en cuestión de pocas horas. Aunque también tiene su parte negativa, ya que no siempre es fácil la interpretación de resultados. Por ejemplo, su elevada capacidad de amplificación será capaz de amplificar también cualquier genoma que pueda aparecer en la muestra debido a una contaminación. Además, no siempre es posible distinguir un caso clínicamente significativo de aquel que no lo es, ni va a ser capaz de discriminar aquellos casos de infección activa de uno latente.

- Seguimiento y pronóstico

En algunos tipos de infecciones, como las infecciones virales por el VIH, por el HCV, el CMV, la determinación cualitativa y/o cuantitativa de la viremia puede ser de importancia. El obtener estos datos va a tener una idea del pronóstico de la infección, así como ser uno de los marcadores de seguimiento en la progresión de la misma. Así mismo, en las infecciones bacterianas, como por ejemplo la sepsis, la detección o no del microorganismo puede ser un marcador de seguimiento tras la aplicación de un tratamiento antibiótico.

- Epidemiología

En el escenario de un brote infeccioso, el uso de las técnicas de PCR nos va a permitir identificar un linaje bacteriano o vírico concreto para asociarlo como el agente causal. Además, nos va a permitir detectar el origen de dicho brote (204, 205). En algunos casos nos llevará incluso a la identificación de patógenos desconocidos hasta ese momento.

- Resistencias farmacológicas

A medida que los conocimientos acerca de los mecanismos genéticos de resistencia de los microorganismos son cada vez mayores, el diseño de PCRs específicas en cada caso nos permite identificar de manera altamente específica, y en cuestión de horas, las posibles resistencias de un patógeno frente a un quimioterápico o un grupo concreto de ellos. Esto lo que permite es solventar los problemas de sensibilidad y especificidad que presentan las pruebas convencionales de resistencias basadas en la expresión fenotípica. Debido a esta rapidez en la obtención de datos, nos ofrece la gran ventaja de ganar un tiempo muy importante a la hora de poder tomar una decisión sobre el tratamiento ya enfocado a un microorganismo concreto, favoreciendo la mejor respuesta y pronóstico del paciente (10).

Hay dos puntos de gran importancia clínica en el ámbito microbiológico. Por un lado, el diagnóstico rápido y preciso del agente etiológico de la infección. Por el otro, el seguimiento de dicha infección una vez aplicado el tratamiento. En muchos casos, la técnica utilizada en ambas situaciones es la PCR, debido a su elevada capacidad para la detección de pequeñas cantidades de material genético. Pero lo que va a suceder es que todo resto de material genético del microorganismo que queremos detectar en nuestra muestra va ser detectado, independientemente de si se trata de un microorganismo vivo, y por tanto susceptible de causar infección, o de un microorganismo muerto que ya no sería posible que causase un cuadro clínico característico. Además, se sabe que el ADN libre, por ejemplo en sangre, puede durar tiempo en circulación antes de ser totalmente eliminado, por lo que va a ser susceptible de ser detectado pudiendo dar una información equivocada tanto en el diagnóstico como en el seguimiento. Una posible vía para ayudar a solucionar estos problemas sería el poder separar el microorganismo o microorganismos por completo de nuestra muestra clínica, por ejemplo sangre, para eliminar cualquier contaminante que pueda interferir y a partir de ahí cultivar para comprobar si hay crecimiento y por tanto microorganismos vivos (viables). Una forma de hacerlo sería, como ya se mencionó en un ejemplo anteriormente, el uso de nanopartículas magnéticas para la adsorción específica de microorganismos en su superficie, y que, con la ayuda de imanes, nos permitirían separarlos a partir de cualquier tipo de muestra o medio (14). Aunque bien es cierto que, de este modo, no seríamos capaces de ver aquellos microorganismos que aún estando vivos no son, por algún motivo, cultivables. Por eso, otra estrategia a la hora de intentar solucionar la detección indiscriminada que se consigue mediante PCR sería la de poder ser capaces de amplificar, y detectar, solamente el material genético de aquellos microorganismos vivos (viables) y descartar el de aquellos que no sean viables (muertos). Este concepto es lo que algunos denominan PCR de viabilidad (v-PVCR).

Estas dos estrategias, usando nanopartículas y la detección diferencial mediante PCR, son abordadas en este trabajo.

1.6 VIABILIDAD Y PCR

La metodología clásica para la determinación de la viabilidad bacteriana se basa en la capacidad de las células para crecer de forma activa y formar colonias visibles en medio sólido (206). Pero lo que se ve es que, en ciertas circunstancias, el número de microorganismos viables puede ser infraestimado por estos métodos. Esto se da en el caso de microorganismos con daños no letales, bacterias no cultivables o con bajo rendimiento de crecimiento, o células viables que han perdido la capacidad de formar colonias en esas condiciones (207, 208). Esto nos lleva a que, en cualquier muestra ambiental o clínica de interés (aire, agua, alimentos), nos vamos a poder encontrar con microorganismos que no seríamos capaces de detectar, y que por tanto supondrían una amenaza para la salud. Para solventar este problema se desarrollaron otras metodologías para demostrar la viabilidad en base a la integridad celular o a la actividad, como la tinción de fluorescencia y la citometría de flujo, el uso de la respuesta fisiológica y la actividad metabólica, así como los análisis basados en los ácidos nucleicos (209-212). Frente a la necesidad de una gran cantidad de tiempo en la aplicación de los métodos clásicos, los métodos moleculares son rápidos, sensibles y específicos, siendo técnicas de gran utilidad en el laboratorio. Esta fácil detección del material genético de un microorganismo mediante PCR nos permite la rápida detección y distinción de las distintas especies bacterianas que pueden estar presentes en gran variedad de muestras. Sin embargo, mediante la PCR no vamos a poder obtener información sobre la viabilidad del microorganismo. Inicialmente, la presencia de secuencias intactas de ADN se usaba como un indicador de la viabilidad celular, ya que se asumía que el ADN no perduraba mucho tiempo en una muestra y era degradado más rápidamente que el resto de los componentes de la célula muerta (213). Aunque ahora se sabe que esta asociación entre viabilidad y presencia de ADN no es real, ya que este puede persistir largo tiempo sin ser degradado en muchos tipos de muestras (214-216). Una posibilidad se vio en el hecho de que el ARN sí que era una molécula que persistía poco tiempo debido a su vida media muy corta, pareciendo así la molécula candidata para correlacionar su detección con la viabilidad. Pero se ve que rARN y mARN son moléculas muy lábiles y que su presencia puede fluctuar dependiendo de múltiples formas de estrés, pudiendo llevar a una correlación poco precisa (217-219). De todos modos, la aplicación de la PCR nos da la posibilidad de detectar cualquier microorganismo en gran variedad de muestras. En la Figura 10 vemos el escenario en el que nos encontramos a la hora de usar la PCR para la detección de microorganismos en cualquier muestra. Vemos que todo aquel que esté presente podrá ser amplificado y detectado, incluidos aquellos que estén muertos (no viables). La gran ventaja de este escenario es que aquellos microorganismos que no sean capaces de crecer, y que se escaparían a la detección clásica, si van a poder ser detectados con la PCR. El siguiente paso de mejora, y sobre el que ya hay literatura, es el

que permitiría conseguir la amplificación selectiva, mediante PCR, solamente del ADN de aquellos microorganismos que sean viables, y que por tanto pueden ser una amenaza para la salud o que ya pueden estar causando una infección.

| Cultivable | Viable no cultivable | No viable |
|----------------------|----------------------|-----------|
| Detectable por PCR | | |
| Detectable por v-PCR | | |

Figura 10: Ejemplo de que microorganismos detectados por PCR y aquellos que teóricamente serían detectados en base a la viabilidad entendida como integridad de membrana celular. (Basado en la figura de Fittipaldi M et al 2011 (220)).

1.6.1 Viabilidad: relevancia clínica

La detección mediante PCR a Tiempo Real de un microorganismo en sangre, para confirmar las sospechas de sepsis, es una técnica rápida y sensible usada en algunos laboratorios. Lo que se consigue con esta técnica es detectar la presencia del material genético del microorganismo en cuestión en la muestra de sangre del paciente, pudiendo de este modo asociar al mismo como agente causal de la infección e implantar un tratamiento antibiótico apropiado en función del microorganismo detectado. Utilizando las técnicas convencionales de extracción de ácidos nucleicos y de detección mediante PCR, esta detección lo único que nos indica es la presencia del microorganismo en la muestra sin poder asegurar la viabilidad del mismo, y por tanto, sin poder asegurar su capacidad para producir una infección y una sintomatología clínica en el paciente. Del mismo modo, en pacientes con sepsis con un tratamiento antibiótico en seguimiento, el uso de estas técnicas nos va a seguir detectando la presencia del microorganismo hasta que este sea eliminado por completo de la sangre, incluso si el tratamiento es efectivo y consigue matar al microorganismo en cuestión. La posibilidad de distinguir con estas técnicas entre aquellos microorganismos que sean viables (vivos) y los que no (muertos), nos permitiría limitar la detección en una muestra de un paciente única y exclusivamente a aquellos microorganismos con capacidad de causar infección activa y clínica en el paciente (dirigiendo mejor el tratamiento antibiótico más adecuado). Además nos permitiría, en pacientes con tratamiento, realizar un seguimiento de la efectividad del mismo. Esto nos permitiría saber con antelación la necesidad de introducir cambios en la terapia, así como el poder acortar los tiempos de tratamiento.

A pesar de que la PCR puede detectar rápidamente la presencia de una secuencia específica de ADN, el de las bacterias muertas todavía es estable en muestras biológicas durante semanas, lo que puede generar falsos positivos en los resultados (221). Así, la viabilidad de los patógenos en una muestra clínica no puede ser fácilmente estimada a partir de la PCR. En consecuencia, esto puede llevar al sobre uso de antibióticos que

pueden inducir a la producción de más bacterias multirresistentes después del tratamiento clínico (222).

La idea de poder realizar esta detección específica de microorganismos vivos surge en base a dos puntos fundamentales (Figura 11):

1. Que entre bacterias vivas y muertas (viables y no viables) nos vamos a encontrar principalmente con diferencias en el estado de su membrana y pared bacteriana. De este modo, las bacterias vivas mantendrán su membrana y su pared totalmente íntegra permitiendo su actividad normal. Mientras tanto, las bacterias muertas tendrán la membrana y la pared dañada y con huecos por toda su superficie;
2. La existencia de sustancias con afinidad por los ácidos nucleicos a distintos niveles y con diferentes efectos a causa de esta unión.

Teniendo esto en cuenta, podríamos buscar moléculas que cumplan dos características. Primero, que sean suficientemente pequeñas para atravesar los huecos de la membrana dañada, pero sin atravesar la membrana íntegra de las bacterias vivas. Segundo, que además de unirse al ADN, esta unión implique algún tipo de cambio o efecto que permita “bloquearlo” para impedir su amplificación mediante PCR. El encontrar moléculas con estas características nos permitiría llevar a cabo la detección específica.

Con esta molécula tipo, lo que haríamos sería tratar a las bacterias con ella, para así lograr la entrada y unión al ADN solamente en aquellas que tengan daños en su membrana (es decir, en las muertas). De este modo, cuando se realice la extracción de ácidos nucleicos y se lleve a cabo la amplificación, aquel ADN al que se unió nuestra sustancia no amplificaría (bacterias muertas), mientras que aquel ADN al que no se unió la molécula amplificará y se detectará (bacterias vivas). Dicho de otro modo, obtendríamos con este tratamiento una detección diferencial entre las poblaciones de bacterias vivas y muertas presentes en la muestra del paciente, con los beneficios ya comentados previamente que supondrían en el diagnóstico y en el seguimiento.

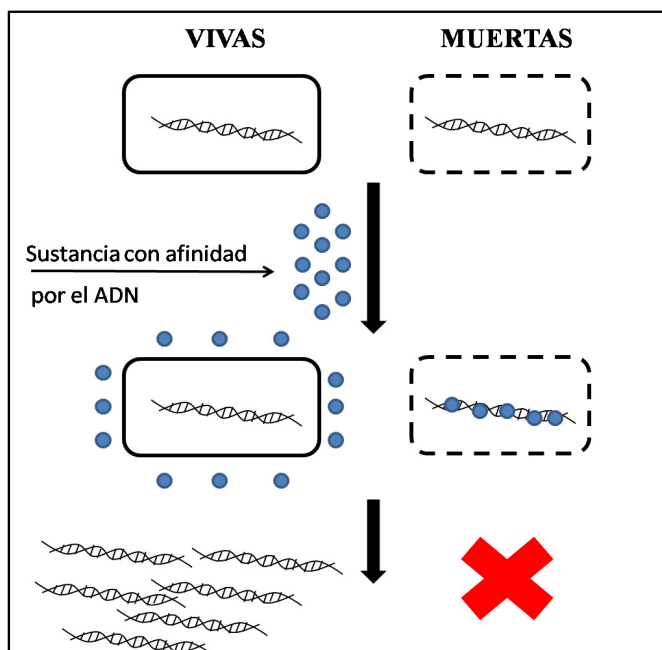


Figura 11: Esquema resumen de la teoría para la detección de viabilidad. Basado en la publicación de Rudi K et al 2005 (223).

1.6.2 Colorantes vitales: Monoazida de Etidio (EMA) y Monoazida de Propidio (PMA)

La base del uso de estas sustancias está en su capacidad de unión al ADN de forma covalente cuando se estimulan con una fuente de luz. La fotólisis de estas sustancias provoca la formación de grupos reactivos, que se unen a ambas cadenas del ADN, impidiendo así la amplificación mediante PCR (220).

El EMA y el PMA son dos colorantes de tinción del ADN de naturaleza fluorescente e impermeables a la membrana (224). Se intercalan en el ADN, y cuando son expuestos a luz visible, la fotólisis produce la formación del radical nitreno, que se puede unir al ADN de forma estable formando un monoadducto (225). En este estado de unión, el ADN no puede ser amplificado mediante PCR (223, 226). Las moléculas de EMA y PMA libres en solución sufren también fotólisis y se convierten a hidroxilamina, perdiendo su capacidad de unión covalente al ADN. La estructura de estos colorantes y los pasos necesarios para la activación y unión al ADN se muestran en la Figura 12 y en la Figura 13, respectivamente.

Debido a que no pueden penetrar a través de la integridad de la membrana celular viva, pueden ser usados para marcar de forma selectiva el ADN de células muertas en una población con ambos tipos de celulares.

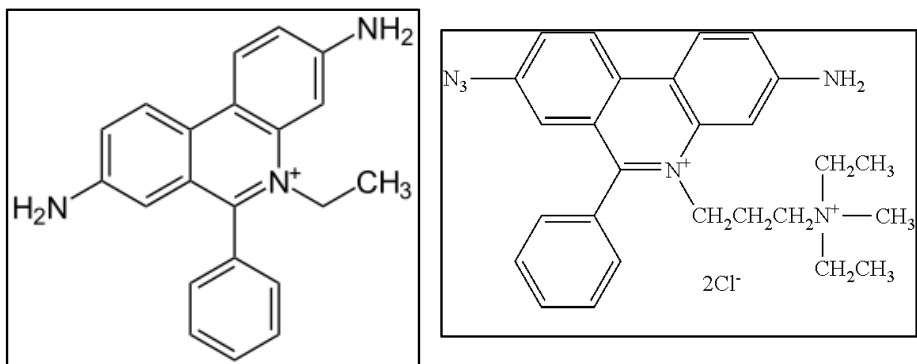


Figura 12: Estructura molecular de los colorantes vitales EMA (monoazida de etidio; izquierda) y PMA (monoazida de propidio; derecha).

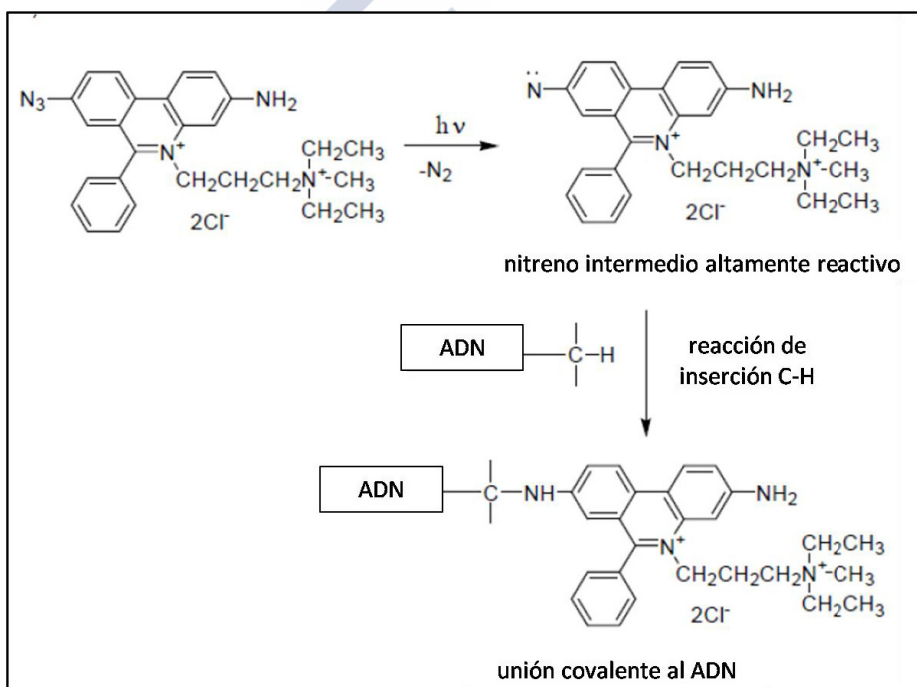


Figura 13: Esquema de la fotoactivación y posterior unión del PMA al ADN. Adaptado de www.biotium.com.

Hay gran cantidad de publicaciones en las que se usan el EMA o el PMA para la detección de microorganismos, y también comparativas entre ambos. Aunque en muchas se reporta pérdida de señal en bacterias muertas usando EMA, también nos encontramos

publicaciones donde indican el funcionamiento no completo de este tratamiento o la mejor aplicabilidad del mismo usando PMA (227).

La primera vez que se describió el análisis selectivo de ADN, a partir de patógenos bacterianos vivos de alimentos usando colorantes vitales, fue en la detección de *E. coli* O157:H7, *L. monocitogenes* y *Salmonella* usando EMA (228). Tras tratamientos químicos y de calor, la combinación de EMA-PCR fue capaz de discriminar entre células vivas y muertas, convirtiendo el uso del EMA en un prometedor método para la detección de la viabilidad. A partir de ese momento, se usó ampliamente para la detección de bacterias viables en cultivos puros y en matrices complejas de alimentos. Aunque algunos estudios posteriores mostraban que el EMA penetraba en las células viables cuando se aplicaba en la detección de *E. coli* O157:H7 (229), y también con otras especies bacterianas (230), resultando en la pérdida parcial de ADN y causando una infraestimación del recuento de microorganismos vivos (231, 232). Entre toda esta controversia, aparecen publicaciones mostrando la utilidad del uso del PMA en la detección de la viabilidad. Lo que se empezó a defender fue que el PMA era más selectivo debido a la mayor carga de la molécula (230), lo que le permitiría penetrar más específicamente a través de la membrana dañada de las células muertas. Por otro lado, hay quien defiende que la diferencia entre género bacteriano puede tener un gran impacto en el efecto de los colorantes vitales, especialmente las diferencias estructurales en la envuelta celular entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (233, 234). En bacterias Gram-negativas, la compleja estructura de la membrana externa representa la principal barrera de permeabilidad, mientras que la correspondiente barrera en Gram-positivos es la capa de peptidoglicano (228). Esta diferencia facilitaría que el PMA penetrara a través de la membrana dañada de bacterias Gram-negativas muertas, y podría explicar la mejor actuación del PMA en la diferenciación entre bacterias vivas y bacterias muertas, con la membrana dañada, dentro de este grupo bacteriano.

Aún con todos estos datos contrapuestos sobre el uso y eficacia de estos colorantes vitales, el uso de estas, la búsqueda de otras moléculas nuevas y su aplicación en el ámbito del diagnóstico microbiológico mediante la v-PCR, podría ser una herramienta complementaria muy útil para el diagnóstico y el seguimiento de las infecciones.

1.6.3 PCR de viabilidad (v-PCR)

La PCR de viabilidad (v-PCR) es, posiblemente, el método que más se ha probado e investigado para intentar discriminar, en una muestra, los microorganismos vivos de los muertos (235-237). Entre la literatura destaca el gran interés y aplicación de este método en muestras alimentarias (227), aunque de forma indirecta van a tener su implicación clínica/ sanitaria, sobre todo viendo muchos de los microorganismos probados. En la Tabla 2 y la Tabla 3 se muestran unos ejemplos de los microorganismos detectados con los colorantes vitales usados para el tratamiento en esta técnica.

En general, los protocolos de v-PCR consisten en la separación de la muestra en dos alícuotas, para tratar a una de ellas con una sustancia con afinidad a los ácidos nucleicos. La molécula utilizada inicialmente en la mayoría de los experimentos es la monoazida de etidio (EMA), aunque se ha ido reemplazando más recientemente por otra sustancia similar, que es la monoazida de propidio (PMA) (230). Las concentraciones usadas en el tratamiento y las condiciones globales del protocolo pueden tener ligeras variaciones entre algunos trabajos pero en general el protocolo es siempre el mismo. Tras un tiempo de incubación en oscuridad, la muestra tratada es fotoactivada por la exposición a una lámpara de luz visible que activa a la sustancia usada, favoreciendo su unión al ADN. Ambas alícuotas son sometidas entonces a un proceso de extracción de ácidos nucleicos y posterior amplificación mediante PCR a tiempo real. Si ambas alícuotas presentan señales similares de amplificación, los microorganismos en la muestra se considera que son mayoritariamente viables (membranas intactas). Por la contra, si la muestra tratada presenta una señal medible más débil, los microorganismos de la muestra se consideran mayoritariamente inactivados. Esa diferencia de señal se refiere a diferencias medibles en el Ct cuando se comparan ambas alícuotas.

La viabilidad en este contexto se basa en el concepto de integridad de membrana, de tal modo que aquellas bacterias que estén muertas tendrán la membrana dañada, y por tanto dejarán de ser impermeables a los colorantes vitales usados en la v-PCR. Pero a pesar de ver que en casos se mostró la capacidad de estos colorantes para discriminar entre bacterias vivas y muertas, también es cierto que hay algunos puntos a tener en cuenta que explicarían, en algunos casos, el fracaso de este procedimiento. Los puntos que algunos autores tienen en cuenta serían los siguientes:

- Que la viabilidad basada en la integridad de la membrana no sería un concepto totalmente completo, ya que no da una medida directa de bacterias vivas y muertas (238), porque, aunque las células con membranas permeables a estos colorantes pueden ser asociadas a no viables, no todas las células no viables tendrían dañada su membrana (239, 240). A pesar de que la integridad de la membrana es un criterio incompleto para definir la viabilidad de la célula, el abordaje mediante la v-PCR ha conseguido resultados positivos en varias publicaciones (241, 242). En esta línea estarían algunos autores, que defienden que se debería considerar más de un único criterio de viabilidad, como por ejemplo ser o no cultivable, la actividad metabólica y la integridad de membrana (226, 243).
- La importancia de la gran variedad de matrices de las que están formados los distintos tipos de muestras en alimentación y muestras ambientales (244). Estas podrían tener un efecto negativo sobre la eficacia de la v-PCR, debido a la presencia de inhibidores que podrían interferir en distintos puntos del proceso de detección (245, 246).
- La concentración del microorganismo o microorganismos en la muestra junto con el límite de detección de la PCR. En muchos tipos de muestras, la cantidad de

patógenos bacterianos se encuentran en niveles muy bajos (entre 10^2 y 10^4 células/gr) (247), mientras que en los mejores casos, el límite de detección más aceptado para la PCR estaría en 10^3 células/gr (248). Por otro lado, se ve que cuando nos encontramos con elevadas concentraciones bacterianas en la muestra, la detección se va a ver limitada. Esto es debido a que, en el momento de la activación del colorante con la fuente de luz, esta elevada masa bacteriana interferiría en el paso de unión al ADN, bien por ensombrecer la luz o bien compitiendo por el colorante (249, 250).

- Ya que cuando estos colorantes entran en la célula se van a intercalar en el ADN, parece mostrada la importancia del tamaño de la secuencia diana de detección. Parece que cuanto más grande es esa secuencia diana, mayor es la probabilidad de que el colorante se intercale en ella (251-254).



| Tipo de alimento | Microorganismo(s) | Colorante vital | Referencia |
|---------------------------------------|---|-----------------|--------------------------|
| <u>Carne</u> | | | |
| Pechuga y patas de pollo | <i>Campylobacter jejuni</i> | EMA | Rudi et al (2005) |
| Carcasas de pollo | <i>Campylobacter</i> | PMA | Josefsen et al. (2010) |
| Pollo y huevos | <i>Salmonella</i> | EMA | Wang and Mustapha (2010) |
| Pollo, ternera y jamón | <i>Salmonella entérica serovars</i> | PMA | Yang et al (2012) |
| Jamón cocido | <i>Salmonella</i> | PMA | Martin et al (2013) |
| <u>Vegetales y zumos</u> | | | |
| Espinacas y ensalada mixta | <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> | PMA | Elizaquível et al (2012) |
| Lechuga | <i>Salmonella</i> | PMA | Liang et al (2011) |
| Lechuga y tomate | <i>S. typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> | PMA | Yang et al (2013) |
| Lechuga y espinacas | <i>E. coli</i> O157:H7 | PMA | Dinu and Bach (2013) |
| Tomate | <i>S. enteric</i> serovars | PMA | Yang et al (2012) |
| Zumos de manzana, naranja o uvas | <i>Zygosaccharomyces bailii</i> | EMA | Rawsthorne et al (2009) |
| <u>Productos lácteos</u> | | | |
| Yogur | <i>Bifidobacterium</i> | EMA | Men et al (2010) |
| Leche pasteurizada | Coliformes totales | EMA | Soejima et al (2012) |
| Leche pasteurizada | <i>Enterobacteriaceae</i> | PMA | Soejima et al (2012) |
| Queso Gouda | <i>L. monocytogenes</i> | EMA | Rudi et al (2005) |
| Leche en polvo | <i>Cronobacter sakazakii</i> | EMA | Minami et al (2012) |
| <u>Pescado</u> | | | |
| Salmón | <i>Photobacterium phosphoreum</i> | PMA | Macé et al (2013) |
| Camarón y salmón | <i>Brochotrix thermosphacta</i> | PMA | Mamlouk et al (2012) |
| <u>Otros</u> | | | |
| Mosto y vino | <i>Oenococcus oeni</i> | PMA | Vendrame et al (2013) |
| Superficies de procesado de alimentos | <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> | PMA | Martinon et al (2012) |

Tabla 2: Ejemplos del uso de colorantes vitales para la detección diferentes bacterias y levaduras a partir de distintos productos alimentarias (adaptado de Elizaquível P et al 2014 (227)).

| Tipo de virus | Proceso de inactivación | Colorante vital | Correcta monitorización | Referencia |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------------------|---|
| <u>Virus entéricos</u> | | | | |
| Coxsakiavirus, Echovirus | Tratamiento con calor | PMA | Si | Parshionikar et al (2010) |
| VHA | Tratamiento con calor | PMA | Si | Sanchez et al (2012) |
| | Procesado a alta presión | | Parcial | |
| Norovirus | Tratamiento con calor | PMA | Si por RT-PCR No por RT-qPCR | Parshionikar et al (2010) |
| Poliovirus | Tratamiento con calor | PMA/EMA | Si | Parshionikar et al (2010) y Kim et al (2011) |
| <u>Otros virus</u> | | | | |
| Gripe aviar | Estabilidad en agua | PMA | No | Graiver et al (2010) |
| Fago MS2 | Tratamiento con calor | PMA | Si | Kim y Ko (2012) |
| Norovirus murino | Tratamiento con calor | PMA | No | Kim y Ko (2012) |
| | | EMA | Si | Kim et al (2011) |
| Fagos T4 | Tratamiento con calor | PMA | No | Fittipaldi et al (2010) |

Tabla 3: Ejemplo de trabajos en los que se usaron colorantes vitales (EMA/PMA) para la detección de virus. (Adaptado de Elizaquível P et al 2014 (227)).

Un punto importante para poder llevar a cabo esta detección diferencial radica en que las sustancias que se intenten usar sean capaces de ser totalmente selectivas a nivel de permeabilidad, y que por tanto solamente sean capaces de atravesar aquellas membranas que estén dañadas. En la Figura 14 podemos ver un ejemplo gráfico de lo que nos podemos encontrar en el caso de usar una molécula cuya permeabilidad no sea la adecuada, comparando al uso de la PCR convencional y la v-PCR. Lo que nos muestra es que nos podemos encontrar con moléculas que acaben entrando en una porción de células viables (fracción a) y por tanto infravalorar el microorganismo presente. Pero también puede pasar que esa sustancia no sea capaz de penetrar en todas las células muertas con la membrana dañada, y por tanto estar detectando (fracción b) e sobrevalorando la presencia de organismos viables.

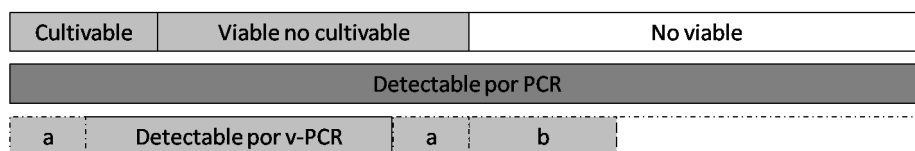


Figura 14: ejemplo de la detección con la v-PCR con el uso de sustancias incapaces de mantener una permeabilidad totalmente selectiva entre membranas dañadas e íntegras, implicando la no detección de algunos de los microorganismos vivos (a) y la detección de algunos microorganismos muertos. Basado en el artículo Fittipaldi M et al 2011 (220)).

El poder desarrollar un protocolo de viabilidad, con una sustancia de unión al ADN sólo de aquellas bacterias que estén muertas, e inhibiendo su amplificación, sería una herramienta muy útil para mejorar la detección de aquellos microorganismos que realmente puedan estar causando o puedan llegar a causar una infección.





2. OBJETIVOS





En todo proceso de detección de un analito, a partir de una determinada muestra, son necesarios múltiples pasos en el procesamiento de la misma hasta poder llegar al punto final en la detección. Desde la toma de muestra y el posterior procesamiento, hasta la realización de las técnicas específicas de la detección, todos son pasos de gran importancia para llegar a un resultado fiable. Por un lado, es importante poseer las técnicas apropiadas para el procesamiento de la muestra original, aislando si es necesario un analito concreto. Por el otro, también es de gran importancia el disponer de técnicas de detección con la suficiente sensibilidad y especificidad. En conjunto, ambos tipos de técnicas van a ser de gran ayuda en el proceso diagnóstico. En el ámbito del diagnóstico microbiológico se ha evolucionado mucho, incorporando en la rutina, junto a las técnicas convencionales, como el cultivo y pruebas bioquímicas, una gran variedad de técnicas moleculares basadas en la PCR (sobre todo en la PCR a tiempo real). Además de que la propia PCR sea lo suficientemente sensible y específica para detectar aquel o aquellos microorganismos de interés, uno de los pasos de mayor importancia para poderla llevar a cabo es la extracción y purificación previa. Este paso nos va a permitir obtener los ácidos nucleicos presentes en nuestra muestra lo más puros posible, y en una cantidad suficiente para que puedan ser detectados. Los métodos más modernos se basan en el uso de nanopartículas magnéticas para la captación, recuperación y concentración de los ácidos nucleicos a partir de cualquier tipo de muestra, eliminando cualquier resto de contaminantes, inhibidores y elementos celulares que puedan interferir en procesos posteriores. La PCR nos permite llevar a cabo la amplificación y detección a partir de cantidades muy bajas de material genético, permitiéndonos una elevada capacidad de detección, aunque como toda técnica tiene un límite de detección a partir del cual no será capaz. Pero esta gran capacidad para poder amplificar cualquier ácido nucleico de nuestra muestra no nos va a permitir discriminar si pertenece a un microorganismo viable o muerto, o incluso si se está amplificando ADN libre en la muestra perteneciente a microorganismos muertos. En este sentido, hay dos puntos que ayudarían a mejorar el diagnóstico microbiológico. En primer lugar, conseguir mejoras en los sistemas de extracción que permitan una mayor recuperación de ácidos nucleicos de calidad, para que puedan ser usados en técnicas posteriores. En segundo lugar, el poder desarrollar protocolos que permitan distinguir mediante PCR la amplificación únicamente de microorganismos viables y que por tanto serán los causantes del cuadro clínico del paciente.

Por este motivo, los objetivos que nos planteamos fueron los siguientes:

1. Diseñar y probar nanopartículas magnéticas para su uso en sistemas automáticos, para intentar mejorar el paso de purificación de ácidos nucleicos, y ayudar así a la mejora en la detección en las pruebas diagnósticas posteriores.

2. Valorar el uso combinado de técnicas de biología molecular (PCR a tiempo real) y de espectrometría de masas (MALDI-TOF) como herramientas de mejora en el diagnóstico, mediante su uso en el análisis de aislados clínicos de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) con resultados discrepantes.
3. Probar la utilidad de nanopartículas magnéticas como agentes útiles para la recuperación de microorganismos a partir de una muestra, así como valorar su compatibilidad con la posterior detección en sistemas basados en técnicas moleculares, para poder usarlas como herramientas útiles en el diagnóstico clínico.
4. Probar el funcionamiento de la detección de la viabilidad usando el tratamiento con EMA y la detección mediante PCR (EMA v-PCR), y valorar la aplicación del protocolo a partir de muestras clínicas.
5. Buscar nuevas sustancias con afinidad por el ADN, para probar su efecto inhibitorio en la amplificación mediante PCR a tiempo real, y poderlas aplicar en la detección de la viabilidad (v-PCR).
6. Desarrollar un protocolo de viabilidad (v-PCR), a partir de muestras de sangre, usando nanopartículas magnéticas para la recuperación de las bacterias, y realizando un tratamiento posterior con sustancias con afinidad por el ADN para probar su utilidad en el ámbito clínico.
7. Valorar el efecto del protocolo de viabilidad (v-PCR) sobre bacterias muertas por efecto de tratamiento antibiótico.





3. MATERIAL Y MÉTODOS





3.1 NANOPARTÍCULAS Y EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ADSORCIÓN INESPECÍFICA)

3.1.1 Valoración inicial del rendimiento con el sistema comercial HAMILTON kPCR (SIEMENS)

Para comparar la capacidad de aquella o aquellas partículas potencialmente útiles para la extracción con un sistema ya validado, se realizó inicialmente una valoración del rendimiento de la extracción del propio sistema (con sus nanopartículas). Esto nos permitirá tener un valor inicial de referencia con el que poder comparar posteriormente nuestras nanopartículas. Para llevar a cabo las extracciones se prepararon diluciones seriadas de la mezcla de los ADN plasmídicos obtenidos del crecimiento en bacterias y posterior extracción. Cada punto de concentración se introdujo por triplicado y se realizó la medición de la concentración de ADN antes de la extracción y al eluido obtenido tras la misma. El volumen de partida de cada muestra fue de 600 μL y el del eluido final de la extracción fue de 50 μL .

3.1.2 Nanopartículas para la mejora en la extracción de ácidos nucleicos

Se usaron distintas nanopartículas de carácter superparamagnético producidas por NANOGAP, una *spin off* surgida a partir del departamento de Química Física de la Facultad de Química (Universidad de Santiago de Compostela). Se utilizaron distintas nanopartículas de óxido de hierro (magnetita) con diferencias en tamaño y envoltura. También se probó a añadir grupos funcionales en la superficie de las mismas para tratar de hacer más específica la unión. De este modo, se intentó obtener unas nanopartículas capaces de adsorber biomoléculas, y que luego podrán ser recuperadas en base a un campo magnético, obteniendo así las biomoléculas de interés, ácidos nucleicos, para su posterior uso, por ejemplo, con técnicas moleculares usadas en diagnóstico. Un resumen de las partículas usadas y sus características se muestra en las siguientes tablas, así como las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) en la caracterización de las mismas (Figura 15).

| FeO-2202 | | | |
|---|---|--|--|
| <u>Descripción</u> Dispersión acuosa de nanopartículas de magnetita | <u>Distribución de tamaño</u> 17 \pm 4 nm | <u>Forma del producto</u> Disperso en agua, pH \approx 13,33 (TMAOH) | <u>Concentración</u> 1,95% wt/wt |
| | <u>Densidad</u> 1,00 g/ml | <u>Densidad de partículas</u> - | |

| FeO-2204 | | | |
|---|--|--|---|
| <u>Descripción</u> Dispersión acuosa de nanopartículas de magnetita revestidas con ácido poliacrílico PAA | <u>Distribución de tamaño</u> 10,5 ± 4 nm (85% part) | <u>Forma del producto</u> Disperso en agua, pH=10 | <u>Concentración</u> 20.2 mg/ml |
| | <u>Densidad</u> 1,00 g/ml | <u>Densidad de partículas</u> 5,25·10 ¹⁸ part/l | |

| FeO-2206 | | | |
|---|---|---|---|
| <u>Descripción</u> Dispersión acuosa de nanopartículas de magnetita revestidas con sílice | <u>Distribución de tamaño</u> 26 ± 3 nm 10 ± 2 nm (core) | <u>Forma del producto</u> Disperso en agua, pH = 8,66 | <u>Concentración</u> 5,25 mg/ml |
| | <u>Densidad</u> 0.99 g/ml | <u>Densidad de partículas</u> ≈2.04·10 ¹⁷ partic/l | |

| FeO-2207 | | | |
|---|---|--|--|
| <u>Descripción</u> Dispersión acuosa de nanopartículas de magnetita revestidas con sílice | <u>Distribución de tamaño</u> 45 ± 3 nm 10,5 ± 3 nm (core) | <u>Forma del producto</u> Disperso en agua pH=9.9 | <u>Concentración</u> 10 mg/ml (25-30 % óxido de hierro, 70-75% sílice) |
| | <u>Densidad</u> 1,0 g/ml | <u>Densidad de partículas</u> ≈ 2.2·10 ¹⁵ partic/ml | |

| FeO-2206-APS | | | |
|--|---|--|---|
| <u>Descripción</u> Dispersión acuosa de nanopartículas de magnetita revestidas de sílice funcionalizadas con aminopropilsilano (APS) | <u>Distribución de tamaño</u> 24,2 ± 3,4 nm 10 ± 2 nm (core) | <u>Forma del producto</u> Disperso en agua, pH = 8,22 | <u>Concentración</u> 4,99 mg/ml |
| | <u>Densidad</u> 1.00 g/ml | <u>Densidad de partículas</u> — | |

| FeO-2207-APS | | | |
|--|---|---|--|
| <u>Descripción</u> Dispersión acuosa de nanopartículas de magnetita revestidas de sílice funcionalizadas con aminopropilsilano (APS) | <u>Distribución de tamaño</u> $47 \pm 4 \text{ nm}$ $10,5 \pm 3 \text{ nm (core)}$ | <u>Forma del producto</u> Disperso en agua pH=9.4 | <u>Concentración</u> 24,86 mg/ml |
| | <u>Densidad</u> 1,0 g/ml | <u>Densidad de partículas</u> $\approx 1.71 \cdot 10^{17}$ partic/ml | |

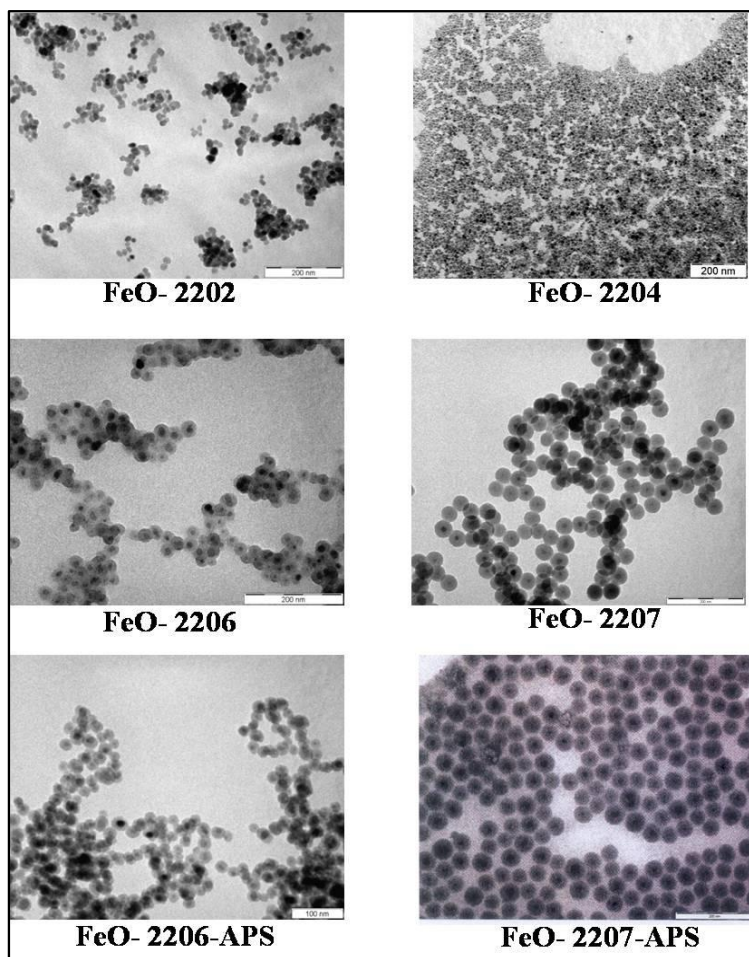


Figura 15: Imágenes obtenidas para la caracterización de cada una de las partículas probadas.

La síntesis de las partículas se realizó usando como referencia la metodología expuesta en la publicación de Kang K et al 2009 (255). Esta se llevo a cabo mediante el método de reacción sol-gel a partir de una mezcla de sales de hierro. La posterior cubierta de sílice se añadió usando el método de Stöber (135) y tomando como referencia la anterior publicación. Como precursor para la hidrólisis y condensación en el proceso de formación de la cubierta de sílice se utilizó el tetraetoxiortosilicato (TEOS), usando cambios en su concentración para conseguir controlar el grosor de la cubierta. Un esquema gráfico de la formación de las nanopartículas se muestra en la Figura 16. Como se indica en las tablas anteriores con las características de cada nanopartícula, algunas de ellas fueron funcionalizadas con grupos reactivos en su superficie buscando una mejora en la adsorción de ácidos nucleicos. Las sustancia usada para funcionalizar la cubierta de las partículas fue el aminopropiltrietoxisilano (APS/APTS).

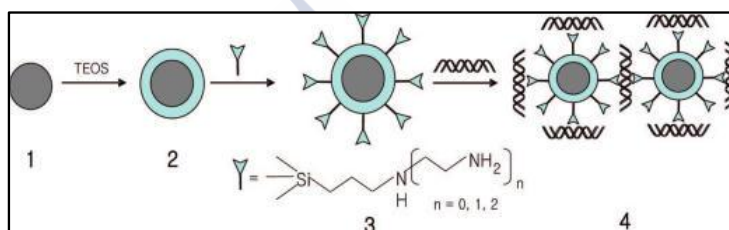


Figura 16: Esquema de los distintos pasos e l obtención de nanopartículas de magnetita recubiertas de sílice y funcionalizadas con grupos con grupos amino reactivos en su superficie para la adsorción de ácidos nucleicos. Figura obtenida de Kang K et al 2009 (255).

Con este método de síntesis, y como se ve en las características de las nanopartículas, se consiguió sintetizar y probar nanopartículas de magnetita desnudas, nanopartículas de magnetita recubiertas con sílice y nanopartículas de magnetita recubiertas con sílice con grupos funcionales en su superficie.

También se probó a usar una nanopartícula en la que se utilizó como revestimiento el ácido poliacrílico (PAA) en vez de sílice.

3.1.3 Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias transformadas

Para la obtención de las bacterias, se utilizó medio de cultivo sólido (Difco™ LB agar, Lennox) para el crecimiento inicial en placa. Para el posterior crecimiento a mayor escala, se usó medio líquido (Difco™ LB Broth, Lennox). Todos los medios fueron preparados añadiéndole ampicilina (Sigma Aldrich) preparada a una concentración de 100 mg/ml.

Para preparar el medio líquido (LB Broth), se añadieron 10 g de medio en 500 ml de agua y se sometió a esterilización en autoclave. Una vez atemperado el medio, se añadieron 500 µl de una solución de ampicilina a 100 mg/ml.

Las placas con medio sólido (LB agar) se prepararon del mismo modo que el medio líquido, pero añadiendo 17,5 g de LB agar. Tras añadir la ampicilina, el medio se repartió en placas petri estériles, y se dejaron solidificar a temperatura ambiente. Una vez listas, se conservaron en nevera hasta su uso.

La ampicilina se preparó disolviendo 0,6 g de la misma en 6 ml de agua estéril para inyección (Meinsol), para obtener una concentración de 100 mg/ml. Posteriormente se guardaron alícuotas a -20 °C para conservarlas hasta su uso.

3.1.4 Enzimas de restricción

Para realizar los cortes de los plásmidos en la etapa correspondiente de identificación, se usaron los enzimas de restricción Apa I, Xma I, Cla I y Hind III de la casa comercial New England BioLabs. Los cortes se hicieron en baño a 37 °C siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.5 Obtención de poblaciones estándar de ácidos nucleicos

Para conseguir una cantidad cuantificable de muestra y en cantidad suficiente para realizar los experimentos, se usaron stocks congelados de *E. coli* DH5α transformada con cinco pseudotipos basados en el plásmido NL4.3 (256, 257). Este plásmido contiene la estructura genética básica del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que nos permite de detectarlo con gran variedad de técnicas moleculares. Estos plásmidos (Tabla 4) se diferencian entre sí por tener sitios de restricción únicos, que nos permiten distinguirlos mediante técnicas como la pirosecuenciación, o con el uso de enzimas de restricción seguido de separación y visualización mediante electroforesis en gel de agarosa. Además portan insertada en una región del plásmido el gen de resistencia a ampicilina.

| Enzimas de restricción | Plásmido | Fragmento resultante |
|------------------------|----------|----------------------|
| Hind III | pNL4.3 | 1480 pb |
| Apa I - Cla I | p4254 | 2248 pb |
| Apa I - Xma I | p4411 | 2405 pb |
| Apa I - Xma I | p4634 | 2628 pb |
| Apa I - Cla I | p4696 | 2690 pb |

Tabla 4: Listado de los plásmidos utilizados y de los enzimas de restricción con los que se realiza el corte en cada uno. Se indica también el tamaño de fragmento resultante que se visualizará mediante electroforesis en gel de agarosa.

A partir de los stocks de glicerol, con la bacteria transformada de forma independiente con cada uno de los plásmidos, se hizo una siembra con asa de 10 μ L en una placa de agar con ampicilina y se incubaron toda la noche en estufa a 37 °C. Esto nos permitió el crecimiento solamente de nuestra bacteria con plásmido. Desde estas placas se seleccionaron cuatro colonias, que se pusieron a crecer en 4 ml de medio líquido con ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C y en agitación continua. De estos tubos con crecimiento se usaron 2 ml para recuperar las bacterias por centrifugación y hacer la extracción del ADN plasmídico usando el kit NucleoSpin® Plasmid (Machery-Nagel, Ref: 740588.50). Una vez extraídos los plásmidos, se utilizó un volumen para hacer el corte con el enzima de restricción correspondiente, y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% para identificar las bandas correspondientes a cada uno y confirmar su identidad. En la Figura 17 se muestra el perfil electroforético para cada uno de los plásmidos.



Figura 17: Imagen de un gel de electroforesis con las bandas correspondientes los distintos plásmidos tras el corte con los enzimas de restricción.

Una vez identificado de forma correcta cada plásmido, y a partir del volumen de los tubos con bacteria crecida, se hizo un nuevo cultivo en medio líquido pero a mayor escala. Para eso, transferimos 500 μ L de bacteria crecida en un matraz con 500 ml de medio de cultivo con ampicilina y se dejó crecer toda la noche a 37 °C en agitación continua. A continuación, se centrifugó todo el medio de cultivo con bacterias en varios

ciclos de centrifugación ($15.000 \times g$ durante 10 minutos) usando tubos estériles de 50 ml para precipitar y recuperar las bacterias, eliminando los restos de medio de cultivo y sustancias que quedan en él. En este punto, si no se iban a procesar a corto plazo, los precipitados se congelaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bien de forma inmediata a la precipitación de las bacterias, o bien tras la congelación, estos precipitados se usaron para extraer de forma específica el ADN plasmídico que portan. Para eso se usaron los reactivos y protocolo del “Plasmid Maxi kit” (Quiagen, ref: 12162). Posteriormente, se realizó el mismo tratamiento con enzimas de restricción y separación por electroforesis para comprobar cada uno de los plásmidos. La recuperación de los plásmidos y la preparación de todas sus diluciones se realizaron siempre con tampón T.E. (pH 8).

3.1.6 Medida de las concentraciones de ADN para calcular el rendimiento de las extracciones

Para conseguir valorar la utilidad de estas nanopartículas en la extracción de ácidos nucleicos y el rendimiento obtenido con las mismas se realizaron mediciones de la cantidad de ADN presente en los plásmidos obtenidos en la extracción a partir de las bacterias, a partir de las diluciones que se prepararon de estos para usar como muestra en las extracciones con las nanopartículas, y también a partir del eluido final recuperado tras los procesos de extracción de ácidos nucleicos en la plataforma automatizada usando nuestras nanopartículas. Estas medidas se realizaron mediante un método fluorimétrico comercial con el sistema Qubit® 2.0 (Invitrogen) y usando los reactivos correspondientes para la detección de bajas cantidades de ADN (Quant-iT dsDNA HS Assay Kit, Ref: Q32851, Invitrogen) y para cantidades altas de ADN (Quant-iT dsDNA BR Assay Kit, Ref: Q32850, Invitrogen), según la necesidad. De este modo, pudimos saber la cantidad de ADN en $\mu\text{g/ml}$ en nuestras muestras de partida, y compararlo después con lo que se obtuvo al final de las extracciones con nuestras partículas. Con ambos valores calculamos el rendimiento de la recuperación en porcentaje. En la Figura 18 se muestra el sistema de medición donde, al introducir un tubo con el reactivo correspondiente y un volumen conocido de nuestra muestra, nos calculará la concentración de ADN en $\mu\text{g/ml}$ de partida. Al mismo tiempo, usa dos calibradores internos, en base a los cuales se realizan los cálculos. Con este dato y con el volumen total de muestra que se usó para la extracción, así como con el volumen en que se recuperó el ADN, pudimos calcular la cantidad total de ADN introducida, la cantidad total recuperada, y calcular así rendimiento de dicha extracción.



Figura 18: Imagen del sistema de medición por fluorimetría usado para calcular la cantidad de ADN presente en las muestras preparadas.

3.1.7 Ensayos de extracción de ácidos nucleicos usando nuevas nanopartículas

Para llevar a cabo las extracciones de ácidos nucleicos se utilizó el sistema abierto de extracción HAMILTON kPCR (Siemens), basado también en el uso de nanopartículas magnéticas para la captura de los ácidos nucleicos en muestras biológicas. Como primer punto a tener en cuenta, al ser un sistema abierto de reactivos, lo que se hizo fue sustituir las partículas propias del aparato por las nuestras que tratábamos de probar.

Para llevar a cabo las extracciones se prepararon diluciones seriadas, en tampón T.E., de la mezcla de los ADN plasmídicos obtenidos de las bacterias. Cada punto de concentración se introdujo por triplicado, y se realizó la medición de la concentración de ADN antes de la extracción y al eluido obtenido tras la misma. El volumen de partida de cada muestra fue de 600 μl , y el del eluido final de la extracción fue de 50 μl . Los valores medios ajustados de cada punto inicial de ADN de las diluciones seriadas fueron de 120, 65, 38, 22, 13, 7, 4 y 2 μg totales presentes en los 600 μl usados por el sistema para la extracción.

3.2 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A METICILINA

Un total de 100 aislados clínicos fueron seleccionados aleatoriamente de la colección de cepas de nuestro laboratorio. Además, se incluyó una cepa de referencia para SARM, la ATCC 43300. En esta selección aleatoria establecimos dos criterios para aceptar las

muestras en el grupo de estudio. Primero, los aislados debían haber sido identificados en el sistema “Microscan Walkaway® Plus instrument” (Siemens) usando el “Pos Combo Panel type 31”. Posteriormente, la resistencia a meticilina debía haber sido confirmada mediante el test de susceptibilidad por difusión con disco de cefoxitina (30 microg; Oxoid). En base a esto, los 101 aislados fueron revisados para comprobar que cumplieran ambos criterios, y a partir de ahí se realizó la detección mediante PCR a tiempo real de forma paralela con dos sistemas de detección: el “BDMax™ MRSA Assay” (Becton Dickinson) y el “LightCycler® MRSA Advanced Test” (Roche). Como se muestra en el esquema de flujo de trabajo de la Figura 19, se llevaron a cabo técnicas fenotípicas y moleculares alternativas a aquellas muestras que presentaron un resultado negativo en al menos una de las técnicas de PCR a tiempo real, con el objetivo de asegurar la fiabilidad del resultado. Las técnicas y sistemas usados fueron el (a) Vitek®2 (tarjeta GP; bioMérieux), (b) “BBL™ Coagulase Plasma Rabbit with EDTA” (Becton Dickinson), (c) BDMax™ Staph SR (Becton Dickinson), (d) GenoType® MRSA kit (Hain Lifescience) y (e) FluoroType® MRSA kit (Hain Lifescience). Para el análisis eventual de distancias genómicas completas se usó la técnica rep-PCR (Diversilab™ Staphylococcus kit (bioMérieux)). Además, se les realizó un análisis por espectrometría de masas por MALDI-TOF usando el sistema MALDI Biotyper (BRUKER) con dos objetivos: por un lado, identificar como *S. aureus* a los aislados con resultado negativo; y por otro lado, para obtener un dendrograma donde los aislados fueran analizados y agrupados para intentar descubrir una posible formación de grupos entre los distintos aislados negativos para cada sistema de PCR a tiempo real. Finalmente, se realizó un tipado de estos aislados basado en PCR para asignarlos a uno de los grupos de clasificación basados en la región SCCmec, para tratar de explicar la posible agrupación de aislados en el dendrograma obtenido. La PCR se realizó usando el protocolo indicado en la publicación de Milheiriço C et al 2007 (258).

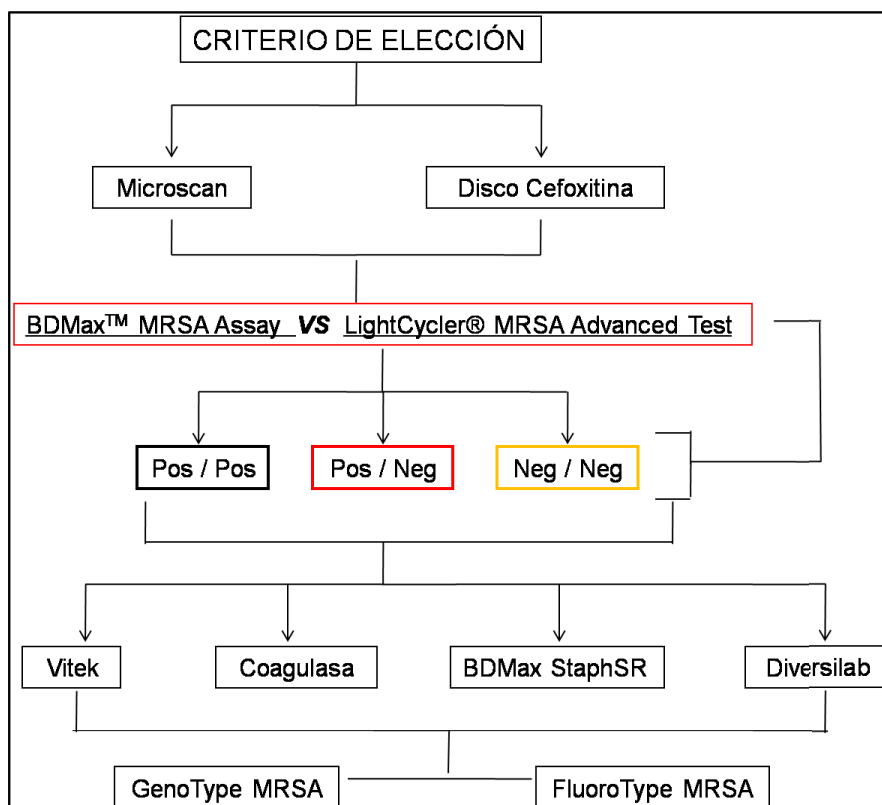


Figura 19: Flujo de trabajo para las distintas pruebas realizadas para la caracterización de los aislados de MRSA.

3.2.1 Sistema Microscan Walkaway® Plus (Siemens)

El sistema Microscan Walkaway® Plus es un sistema totalmente automatizado en el que se lleva a cabo la identificación bacteriana y la determinación de la susceptibilidad antibiótica usando el panel “Pos Combo Panel Type 31”. Todas las muestras fueron procesadas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.2 Difusión con disco de cefoxitina

El test de susceptibilidad por difusión en disco de cefoxitina 30 µg (Oxoid) se hizo a las muestras para confirmar la resistencia a metilina. Se preparó una solución 0,5 McFarland de cada aislado y se hizo una siembra en césped en placas de agar sangre. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 horas y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición. Siguiendo la guía del CLSI (Clinical and Laboratory Standards institute), una zona de inhibición con un diámetro ≤ 21 mm fue considerada como resistente a metilina, y con un valor ≥ 22 mm fue considerada como sensible (259).

3.2.3 BDMax™ MRSA Assay (Becton Dickinson)

El test “BDMax™ MRSA Assay” es un ensayo diagnóstico cualitativo automatizado *in vitro* para la detección directa de ADN de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) a partir de hisopos nasales en pacientes con riesgo de colonización. El ensayo utiliza la PCR a tiempo real para la amplificación del ADN perteneciente a SARM y sondas de hibridación específicas marcadas con fluoróforos para la detección del amplificado. El ensayo detecta de forma simultánea la región SCCmec y una secuencia específica de *S. aureus* localizada en el gen orfX. Todas las muestras fueron procesadas siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.4 LightCycler® MRSA Advanced Test (Roche)

El test “LightCycler® MRSA Advanced Test” (ROCHE) es un test diagnóstico cualitativo *in vitro* para la detección directa de colonización nasal con SARM para ayudar en la prevención y control de las infecciones por MRSA en el ámbito hospitalario. La prueba está diseñada para detectar una secuencia propia indicativa de la integración de la región SCCmec en el cromosoma de *S. aureus* (unión del gen SCCmec/orfX), indicando la presencia del ADN perteneciente a MRSA. Todas las muestras fueron procesadas siguiendo las recomendaciones del fabricante y la PCR a tiempo real se llevó a cabo en el sistema LightCycler®.

3.2.5 Sistema Vitek®2 (bioMérieux)

El Vitek®2 es un sistema totalmente automático que realiza la identificación bacteriana y el test de susceptibilidad antibiótica. Todas las muestras se analizaron usando a tarjeta “GP ID card” para la identificación de bacterias gram-positivas. Todas las aisladas se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.6 Prueba de la coagulasa

El criterio usado de forma más amplia y globalmente aceptado para la identificación de estafilococos asociados a una infección aguda está basado en la presencia del enzima coagulasa (260). El test “BBL™ Coagulase Plasma Rabbit with EDTA” (Becton Dickinson) se usa para determinar cualitativamente la patogenicidad de los estafilococos usando el método directo e tubo. Las pruebas se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.2.7 BDMax™ Staph SR (Becton Dickinson)

El test “BDMax™ Staph SR Assay” es un ensayo diagnóstico cualitativo *in vitro* automatizado para la detección directa de ADN de MRSA a partir de hisopos nasales de pacientes en riesgo de colonización. El test utiliza la PCR a tiempo real para la detección

directa de regiones específicas para *S. aureus* (MREJ) y para MRSA (*mecA*, *mecC*, *nuc*). Todas las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.8 GenoType® MRSA (Hain Lifescience)

El ensayo “GenoType® MRSA test” permite la identificación genética molecular de *S. aureus* y *S. epidermidis* a partir de cultivo. Además, se detectan también de forma simultánea el gen *mecA* (que confiere resistencia a meticilina) así como un fragmento específico del gen PVL. Usando el ADN obtenido a partir de cultivo de la bacteria se realiza una PCR múltiple cuyo amplificado se usará para realizar una hibridación reversa. Todas las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.9 FluoroType® MRSA (Hain Lifescience)

El ensayo “FluoroType® MRSA test” permite la detección directa de cepas de MRSA a partir de muestras de las muestras de pacientes. A partir de hisopos nasales, se realiza una extracción de ADN y a continuación se lleva a cabo una PCR basada en la tecnología HyBeacon, usando sondas marcadas con fluorescencia y el análisis de curvas de melting, permitiendo la identificación del MRSA. Todas las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.10 Análisis de distancias genómicas (Diversilab™ Staphylococcus kit (bioMerieux))

Con el objetivo de buscar similitudes entre las muestras con resultado negativo para alguno de las pruebas de detección de MRSA, realizamos un estudio genético usando la tecnología rep-PCR (Diversilab™ Staphylococcus kit (bioMerieux)) que nos permite realizar un análisis de distancias genómicas entre distintos aislados. Con este análisis esperamos encontrar grupos de muestras negativas que nos permitan explicar las diferencias entre los resultados. También se analizaron muestras positivas con el objetivo de poder comparar los resultados.

Esta tecnología, conocida como PCR de secuencias repetitivas (rep-PCR), permite la amplificación de fragmentos de diferentes tamaños de secuencias repetitivas no codificantes que se encuentran intercaladas a lo largo de los genomas de todas las bacterias. Además, estas secuencias repetitivas están organizadas de forma diferente, permitiendo un análisis de huella genética que nos va a conseguir diferenciar entre aislados bacterianos. Una vez realizada la PCR, se hace una separación electroforética y un análisis de las distancias genéticas usando el software del sistema.

3.2.11 Análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI Biotyper (BRUKER))

A los aislados negativos se les realizó un análisis mediante espectrometría de masas. Estos aislados se dejaron crecer toda la noche en placas de agar sangre y se procesaron siguiendo las especificaciones del fabricante para la identificación con el sistema MALDI Biotyper. A partir de la placa, se tomó parte de una colonia y se dispersó en la posición correspondiente de la placa. Se dejó secar y se le añadió 1 µl de ácido fórmico al 70%. Cuando este se secó, se añadió 1 µl de matriz. Una vez seca, se introdujo en el sistema para su análisis.

Para la creación de los dendrogramas que nos permitirán comparar la similitud entre aislados, se llevó a cabo una extracción con etanol/ ácido fórmico siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, se introdujeron en el sistema y se analizaron un mínimo de 20 y un máximo de 24 espectros para cada aislado para obtener un espectro consenso final único. Una vez obtenido este espectro para todos los aislados se puede realizar el dendrograma y compararlos.

3.2.12 Tipado en base a la región SCCmec

Se llevó a cabo una PCR para el tipado de los aislados en base a la región SCCmec de los tipos I a VI usando la PCR de Milheiriço C et al 2007 (258). Para identificar los fragmentos amplificados y definir a cada aislado con un tipo específico de SCCmec se llevó a cabo una separación electroforética de los mismos. Esta prueba se realizó a todas las muestras negativas y a la cepa de referencia ATCC 43300 para SARM.

3.3 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE ADSORCIÓN ESPECÍFICA CON NANOPARTÍCULAS

Para demostrar la utilidad de las nanopartículas magnéticas para la separación específica de microorganismos previa a la detección por sistemas convencionales de PCR a tiempo real usados en laboratorios diagnósticos se llevaron a cabo ensayos de separación usando dos tipos de nanopartículas diseñadas para la unión a microorganismos. Estas partículas fueron obtenidas de la compañía NANO MR (USA) y de ApoH Technologies (Francia) y su capacidad para la unión a microorganismos y su aislamiento a partir de una muestra se probó con un total de 13 microorganismos elegidos del panel de detección de la técnica SeptiFast (ROCHE) usada para el diagnóstico en pacientes con sospecha de sepsis. De este panel fueron seleccionados 4 microorganismos gram positivos (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*), 4 gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) y 5 hongos (*Candida*

parapsilosis, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida krusei*). Cada microorganismo fue siempre probado en duplicado.

3.3.1 Sistemas de detección

3.3.1.1 LightCycler SeptiFast Test (Roche Diagnostics GmbH)

El kit “LightCycler SeptiFast test M^{grade}” (Roche Diagnostics GmbH) es un ensayo de PCR multiplex a tiempo real que es capaz de detectar la presencia de ADN de 25 especies de bacterias y hongos de relevancia en sepsis y en la infección nosocomial. Los microorganismos que cubre este test son la causa de aproximadamente el 90% de todas las infecciones del torrente sanguíneo, y el rango de especies incluye a aquellas que son más frecuentemente tratadas de forma inadecuada, así como aquellas que producen las infecciones más difíciles de tratar (261, 262).

3.3.1.2 BD MAXTM MRSA XT (Beckton Dickinson)

Se trata de un kit de extracción de ácidos nucleicos y PCR a tiempo real para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina en pacientes portadores a partir de hisopos nasales. Para la amplificación usa como dianas la región MREJ (SCCmec right-extremly junction), y los genes *mecA* y *mecC* de resistencia a meticilina.

3.3.2 Cepas de referencia y medios de cultivo

Para llevar a cabo los experimentos se usaron las cepas de colección ATCC indicadas en la Tabla 5.

Para crecer los hongos se incubaron a 37 °C en placa de sabourea. Para las bacterias se usaron placas de agar sangre con incubación a 37 °C en aerofilia, excepto para *S. agalactiae* y *S. pneumoniae* que se incubaron en estufa de CO₂.

| Microorganismos | | |
|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Gram Positivos | Gram Negativos | Hongos |
| <i>S. agalactiae</i> ATCC 13813 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 |
| <i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619 | <i>A. baumannii</i> ATCC 19686 | <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 |
| <i>E. faecium</i> ATCC 35663 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 70063 | <i>C. glabrata</i> ATCC 1526 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 43300 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>C. albicans</i> ATCC 90028 |
| | | <i>C. krusei</i> ATCC 6258 |

Tabla 5: Listado con las referencias de los microorganismos de colección usados en los ensayos.

3.3.3 Tipos de nanopartículas

3.3.3.1 Nanopartículas de NANO MR

Desarrolladas por la empresa NANO MR Inc (Albuquerque, USA) actualmente perteneciente a la compañía DNA electronics (dnae, UK). Nanopartículas de carácter superparamagnético que, al ser sometidas a un campo magnético, van a poder ser recuperadas de un medio complejo, como por ejemplo, una muestra clínica. Estas partículas están modificadas en su superficie con anticuerpos monoclonales de unión específica e inespecífica a gran diversidad de patógenos.

3.3.3.2 Nanopartículas de ApoH

Se trata de unas nanopartículas de carácter superparamagnético que, al ser sometidas a un campo magnético, van a poder ser recuperadas de un medio complejo, como por ejemplo, una muestra clínica. Además, estas nanopartículas están modificadas en su superficie por la unión de la apolipoproteína H (ApoH). Se trata de una proteína de fase aguda que, cuando es activada, se une con una relativa alta afinidad a patógenos o sus proteínas, motivo por el que está considerada como un elemento de la respuesta inmune innata del hospedador. Esta propiedad es usada como medio para mejorar drásticamente el diagnóstico de patógenos de diferentes orígenes (humano, animal o ambiental y de la naturaleza), incluyendo virus envueltos y no envueltos, parásitos y bacterias gram positivas y gram negativas. Por eso, la ApoH activada y unida a soportes sólidos es usada para concentrar y “limpiar” patógenos de posibles inhibidores presentes en la muestra. De este modo, van a poder ser detectados por métodos moleculares o inmunológicos, pudiendo así evitar los diagnósticos con falsos positivos. Por esto, el uso de estas partículas se presenta como un apoyo para el proceso diagnóstico a partir de muestras complejas o con inhibidores como puede ser la sangre.

Ambos tipos de partículas se conservaron y utilizaron en las condiciones y con los medios indicados por los fabricantes.

3.3.4 Pruebas de captura de microorganismos

Para los ensayos de captura de microorganismos con nanopartículas se prepararon soluciones en agua estéril para inyección (Meinsol) para los 13 microorganismos y se les añadieron las partículas para extraer las bacterias y detectarlas tanto mediante cultivo en placa como mediante PCR a tiempo real. Todas las soluciones bacterianas que se realizaron para estas pruebas y las posteriores de otros apartados se realizaron usando ampollas de agua estéril para inyección. Para abreviar, en las descripciones posteriores nos referiremos a ella simplemente como agua. Para llevar a cabo las pruebas de captura, estos microorganismos se mezclaron y se procesaron en tres grupos separados tal y como se muestran en la Tabla 5. Los microorganismos que presentaron problemas en la

detección en mezcla fueron posteriormente procesados de forma individual, como se explicará más en profundidad en los resultados.

Para preparar las soluciones bacterianas se partió de una dilución 0.5 McFarland en agua, a partir de la cual se diluyó para obtener una concentración aproximada de $1E4$ cfu/ml. A partir de esta dilución fue desde donde se usó cada solución bacteriana para realizar la mezcla para conseguir una concentración final estimada de 1.000 cfu/ml para cada bacteria en la mezcla, haciendo una dilución 1/10 a partir de cada una. Se usó un total de 1 ml de la mezcla por réplica en las partículas NANO MR. Para las partículas ApoH se preparó a 2.000 cfu/ml del mismo modo, ya que se usaron 500 μ l de mezcla en cada réplica siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para preparar los hongos se comprobó que usando los mismos cálculos, posiblemente debido a la diferencia de tamaño entre hongos y bacterias, no se conseguían detectarlos partiendo de esa cantidad teórica de colonias. Así se partió de la dilución teórica $1E6$ cfu/ml para hacer la dilución y obtener la mezcla final de hongos. Tanto para bacterias como para hongos se sembraron 10 μ l de las soluciones previas a la mezcla para estimar la cantidad real de cfu/ml usada en los experimentos, y asegurarse así de un recuento suficiente de microorganismo ante posibles resultados extraños.

Las partículas NANO MR se suministran en modo de esfera seca que se debe resuspender en 10 ml del tampón de unión suministrado por la casa comercial para poder ser utilizadas. Para la prueba se mezcló 1 ml de cada mezcla bacteriana/hongos con 1 ml de partículas y se incubaron durante 35 minutos en agitador orbital a 37 °C (condiciones indicadas por la casa comercial). Tras la incubación se pusieron los tubos en un imán durante 10 minutos para retener las partículas y se retira el sobrenadante. Posteriormente se hizo un lavado de las partículas con 2 ml de tampón de lavado de la casa comercial. Se situaron los tubos nuevamente en el imán 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron finalmente en 1 ml de agua. Esta solución de partículas se usó para la extracción de ácidos nucleicos en el sistema MagNA Pure Compact (ROCHE) y la posterior amplificación por PCR a tiempo real con el kit SeptiFast para LightCycler (ROCHE). Para la extracción se usó el protocolo recomendado por el fabricante, con 400 μ l de muestra (en nuestro caso solución de partículas unidas a bacterias/hongos) y un volumen de elución para el ADN recuperado de 200 μ l, de los que para la amplificación se usaron posteriormente 50 μ l con 50 μ l de la mezcla de PCR correspondiente (gran positivos, gran negativos y hongos). Para comprobar la compatibilidad de estas partículas con otro sistema automático de extracción, se usó también el sistema BD MAX (extracción y PCR a tiempo real integrada y automatizada) con el kit MRSA XT para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM). Para las pruebas en este sistema se usó únicamente muestra con *S. aureus*. En este caso se usaron 200 μ l de la solución de partículas con bacteria obtenidas tras la separación y el sistema realizó de forma continua la extracción y la amplificación.

Para las partículas ApoH se usó el mismo proceso, pero siguiendo las recomendaciones del fabricante se usaron 500 µl de solución bacteriana a la que se le añadió 500 µl de un tampón a concentración 2X proporcionado por la casa comercial, y finalmente, 20 µl de partículas. Se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en agitador orbital. A continuación se situaron en un imán durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de agua. Se pusieron los tubos nuevamente en el imán 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se recuperaron las partículas en 500 µl de agua. La detección se hizo de igual modo que en las otras partículas, y usando una muestra sólo con *S. aureus* cuando la detección se llevó a cabo con el sistema BD MAX.

A continuación se muestran imágenes correspondientes tanto a la recuperación de las partículas en el imán (Figura 20) como a la incubación y mezcla en agitador orbital (Figura 21) que son usados en todos los experimentos donde se usaron las nanopartículas magnéticas.



Figura 20: Imagen de la recuperación de las nanopartículas al situar los tubos en un imán. A la izquierda se ven dos tubos con las partículas ya separadas de medio líquido. A la derecha, la comparativa con dos tubos en el momento inicial en que son situados en el imán.



Figura 21: Imagen de tubos de muestra con nanopartículas situados en el agitador orbital en el proceso de incubación para la mezcla de las muestras.

3.4 MEJORA DE LA DETECCIÓN MOLECULAR (PCR DE VIABILIDAD)

3.4.1 Esquema general del protocolo de tratamiento con cisplatino en el test de viabilidad

Como se indica a lo largo de los siguientes apartados, el test de viabilidad consiste en el tratamiento de una muestra en la que hay presente una cantidad de microorganismo vivo, muerto o ambos, para posteriormente ser capaz de, mediante PCR a tiempo real, llegar a una detección diferencial, de tal modo que sólo se lleve a cabo la amplificación del ADN de aquel microorganismo que esté vivo. En la Figura 22 se muestra de forma esquematizada el desarrollo general de los distintos ensayos del test de viabilidad. En los ensayos se parte siempre de dos grupos de muestras en duplicado: uno formado por bacterias vivas y otro por bacterias muertas, en las cuales uno de los duplicados se le aplica el tratamiento y el otro sirve como control para comparar los resultados. En los ensayos se añade un tercer grupo de muestras en las que las bacterias vivas y muertas se mezclan en iguales cantidades y se procesan igualmente en duplicado. El grupo de muestras no tratadas sufre las mismas incubaciones y procesos de lavado, lo único que cambia es que se les añade el mismo volumen de agua que volumen de sustancia de tratamiento es añadida a las tratadas. Una vez pasado el tratamiento y el lavado/procesado para limpiar de sustancia sobrante que pueda interferir, se realiza la extracción de ácidos nucleicos en un sistema automático y se lleva a cabo la PCR a tiempo real para poder ver el efecto o no de inhibición del tratamiento y poder compararlo con los controles.

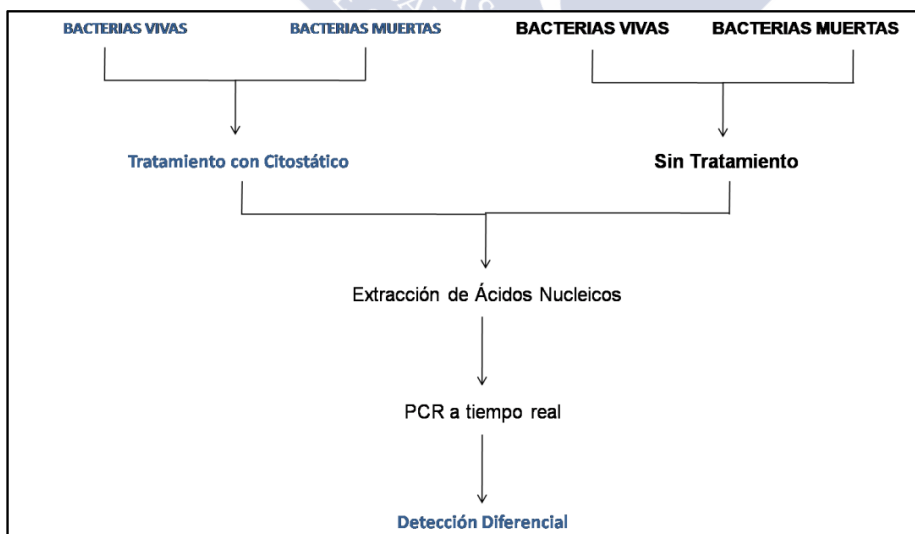


Figura 22: Esquema general de los pasos de protocolo de viabilidad.

3.4.2 Cepa de referencia y preparación de la muestra

Para llevar a cabo los diferentes ensayos se utilizó una cepa de colección para *S. aureus* resistente a meticilina con referencia ATCC 43300. Para su crecimiento la bacteria se sembró en placas de agar sangre y se dejó crecer a 37 °C toda la noche.

Las soluciones bacterianas se prepararon en agua a partir de la bacteria crecida en placa. Para ello se preparó una solución 0.5 McFarland, que luego se diluyó para conseguir una solución bacteriana con una concentración de 1E4 cfu/ml. Una vez conseguida la concentración de trabajo se realizaba una siembra en placa para comprobar el crecimiento y poder comparar con los resultados.

Como para los diferentes ensayos es necesario contar con dos poblaciones distintas de bacterias, vivas y muertas, a partir de la solución obtenida se retiró una parte y se sometió a un shock térmico en un baño a 80 °C durante tres minutos para así matar las bacterias, y se pasó inmediatamente a hielo para atemperar la solución. Para establecer estas condiciones de incubación se realizaron varios experimentos con tiempos de incubación entre 1 y 10 minutos, con incrementos de 1 minuto, y con la posterior siembra en placa de 100 µl de la solución de bacterias e incubación durante al menos 24 horas para comprobar la presencia o ausencia de crecimiento.

Para las pruebas realizadas a partir de sangre, las bacterias se obtuvieron del mismo modo mencionado arriba, y a continuación se añadieron a la sangre para obtener la misma concentración teórica de 1E4 cfu/ml.

3.4.3 Extracción de ácidos nucleicos y detección mediante PCR a tiempo real

Para llevar a cabo la extracción de ADN y su posterior detección, se utilizaron dos de los sistemas automáticos de extracción y su sistema de PCR a tiempo real correspondiente disponibles en nuestro laboratorio para su uso en la rutina diagnóstica. Por un lado se usó el sistema de extracción MagNA Pure (Roche) y su sistema independiente para detección LightCycler (Roche) usando el kit de detección múltiple de microorganismos SeptiFast (Roche).

El sistema MagNA Pure es un sistema de extracción automático que utiliza la lisis enzimática de la muestra y nanopartículas magnéticas para la captura de los ácidos nucleicos. El sistema LightCycler es un termociclador para realizar PCR a tiempo real que utiliza capilares que se calientan por corriente de aire. El kit de PCR SeptiFast consiste en una multiplex RT-PCR para la detección simultánea de 24 microorganismos con implicación en cuadros de sepsis. Para ello consta de tres mezclas distintas de reacción correspondientes a los microorganismos agrupados en gram positivos, gram negativos y hongos. En la extracción se parte de 400 µl de muestra y se recuperan 200 µl de eluido, de los que se usarán para la PCR 50 µl para cada grupo de

microorganismos con 50 µl de la mezcla correspondiente de PCR. Los mismos volúmenes se usan para los controles positivos y negativo en la misma PCR.

El otro sistema que se usó es el BD MAX (Beckton Dickinson) es un sistema automático con extracción y PCR integrados en el mismo sistema. El método de extracción está basado en la lisis enzimática y el uso nanopartículas magnéticas para la captura de los ácidos nucleicos. El sistema tiene incorporados dos termocicladores para realizar PCR a tiempo real con pequeños volúmenes de reacción (PCR microfluídica). Para realizar los experimentos en esta plataforma se usó el kit MRSA XT (Beckton Dickinson) para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina. El volumen necesario para realizar la prueba es de 200 µl.

3.4.4 Búsqueda de sustancias

Se usaron distintas sustancias que fueran impermeables frente a una membrana íntegra, pero con un tamaño suficiente para ser permeables a membranas dañadas. Además, debían ser susceptibles de tener cierta afinidad o actividad sobre los ácidos nucleicos, ya fuese por unión estable a los mismos o por un efecto de degradación, pudiendo así afectar a la capacidad de ser amplificado y detectado mediante PCR. Distintas sustancias fueron probadas sobre soluciones de bacterias muertas comparadas con bacterias vivas para comprobar el posible efecto sobre la amplificación mediante PCR, así como la posible toxicidad o algún efecto detectable en las bacterias vivas. Las sustancias fueron el EMA (Ethidium monoazide bromide) como agente colorante para tinciones por su afinidad al ADN y distintos citostáticos (cisplatino, oxaliplatino, mitomicina, chromomicina, 5-fluoracilo, camptotecina, amsacrina, mitoxantrona, elipticina, etoposido) con actividad sobre el ADN en quimioterapia.

3.4.4.1 Monoazida de Etidio (EMA)

Se trata de una sustancia colorante intercalante del ADN que sólo puede atravesar las membranas dañadas de bacterias muertas, ya que es prácticamente impermeable al paso a través de estas, y que se une covalentemente al ADN celular tras su activación con luz. Para realizar las pruebas se usó EMA suministrado por Sigma-Aldrich (Ethidium Monoazide Bromide, Ref: 22028).

3.4.4.2 Cisplatino y Oxaliplatino

El cisplatino (Cis-Diammineplatinum(II) dichloride; ref: P4394, SIGMA-ALDRICH) y el oxaliplatino (Oxaliplatin; ref: O9512, SIGMA-ALDRICH) (Figura 23) son medicamentos usados en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Estos complejos basados en el platino son agentes alquilantes que reaccionan *in vivo* con el ADN celular mediante puentes cruzados entre las bases, impidiendo así la replicación y la transcripción y causando la apoptosis de la célula. Debido a esta afinidad por el

ADN, se presentaban como moléculas candidatas a ser probadas para desarrollar el protocolo de viabilidad. Ambos compuestos fueron resuspendidos usando solución salina al 0,9 %, que se usó también para preparar las correspondientes diluciones.

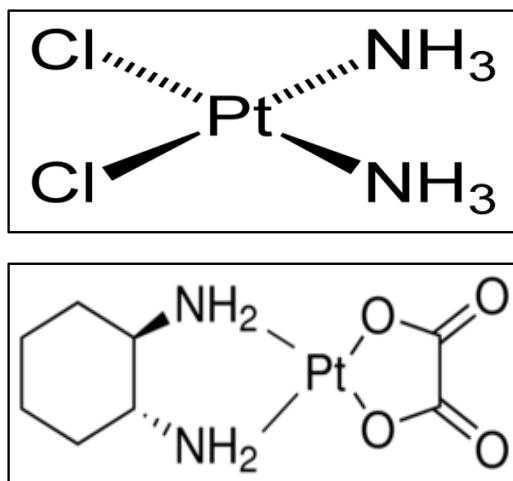


Figura 23: Imagen mostrando la estructura molecular del cisplatino (parte superior) y del oxaliplatino (parte inferior).

3.4.4.3 Otras sustancias con efecto citostático

El resto de sustancias probadas fueron suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich (chromomicina (Ref: C2659); 5-fluoracilo; camptotecina (Ref: C9911); amsacrina (Ref: A9809); mitoxantrona (Ref: M6545); elipticina (Ref: E3380); etoposido (Ref: E1383). Para resuspenderlos se utilizó solución salina al 0,9%. Todos ellos fueron probados a distintas concentraciones (200 y 350 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para valorar su actividad sobre bacterias vivas y muertas. Las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los lavados para recuperar las bacterias y eliminar los restos de sustancias se hicieron mediante centrifugación a 12.000 rcf durante 5 minutos.

3.4.5 Pruebas con Monoazida de Etidio (EMA)

Para estas pruebas nos basamos en la metodología general disponible en un buen número de publicaciones (230, 263, 252), pero combinando algunas condiciones debido a la variación entre artículos en parámetros como la concentración de tratamiento o tiempos de incubación y exposición.

La forma en la que se obtuvieron las bacterias vivas y muertas, así como la cepa de referencia de *S. aureus* utilizada, son las indicadas en puntos anteriores. Siguiendo lo visto en la literatura, el EMA fue resuspendido en DMSO al 20%. Las soluciones de trabajo se prepararon a diferentes concentraciones para realizar el tratamiento. Las concentraciones de tratamiento final probadas fueron de 1.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ finales de

EMA. Se usaron 750 µl de bacterias vivas y muertas por duplicado. A uno de los duplicados de cada grupo de bacterias se le añadió 750 µl de EMA y se dejaron incubar durante 5 minutos en hielo y en oscuridad envuelto en papel de aluminio. A continuación se les quito el papel de aluminio, y sobre el hielo se expusieron a una fuente de luz situada a 20 cm durante 5 minutos. Para ello se usó una lámpara halógena de 500 W. A continuación se centrifugaron las muestras a 12.000 rcf durante 5 minutos y se recuperaron en el mismo volumen de partida de la muestra, para a continuación realizar la extracción de ácidos nucleicos y la posterior detección por PCR a tiempo real. Para el sistema de Extracción MagNA Pure se usaron 400 µL de muestra y el eluido se usó para la PCR en el sistema LightCycler. Para el sistema BD MAX se usaron 200 µL de muestra y el sistema realizó de forma automática y continuada la extracción y la PCR a tiempo real.

3.4.6 Prueba de control con ADN libre tratado con cisplatino

Ante la falta de referencias de un uso parecido para esta sustancia, se hizo esta prueba de unión a ADN libre.

Para probar la unión del cisplatino al ADN, y comprobar su posible efecto inhibitorio de la amplificación mediante PCR, se usó directamente una solución con ADN libre a la que se le añadió el cisplatino. Como solución de ADN se usó uno de los controles positivos de la PCR a tiempo real comercial SeptiFast (Roche) que detecta de forma simultánea hasta 24 microorganismos. En el ensayo de PCR se usó el cisplatino y los controles positivos por separado (haciendo de blanco y de control de amplificación respectivamente), así como una serie de muestras con distintas proporciones de solución de ADN y cisplatino, que se dejaron incubar a temperatura ambiente 10 minutos antes de usarlos para la amplificación. Las muestras del experimento se muestran en la Tabla 6.

| | |
|---|--|
| | |
| 1 | Cisplatino 1.400 µg/ml (50 µl) |
| 2 | RC G(-) (50 µl) |
| 3 | RC G(-) (50 µl) |
| 4 | 50 µl RC G(-) + 10 µl Cisplatino 1.400 µg/ml |
| 5 | 50 µl RC G(-) + 30 µl Cisplatino 1.400 µg/ml |
| 6 | 50 µl RC G(-) + 50 µl Cisplatino 1.400 µg/ml |
| 7 | 50 µl RC G(-) + 70 µl Cisplatino 1.400 µg/ml |
| 8 | 50 µl RC G(-) + 90 µl Cisplatino 1.400 µg/ml |
| 9 | 25 µl RC G(-) + 50 µl Cisplatino 1.400 µg/ml |

Tabla 6: Listado con las muestras usadas en la prueba de amplificación con cisplatino.

3.4.7 Condiciones iniciales de trabajo con cisplatino

Para establecer las condiciones finales de trabajo se probaron distintas condiciones de concentración de tratamiento con cisplatino, así como tiempos y temperaturas de incubación de dicho tratamiento. Inicialmente, se probaron en el sistema LightCycler unas condiciones de incubación a temperatura ambiente, durante 10 minutos, y con unas concentraciones de 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$. El siguiente paso en este sistema fue cambiar las condiciones amentando la concentración del cisplatino a 350 $\mu\text{g/ml}$ con unos tiempos de incubación de 35 y 45 minutos.

En este punto se intentó comparar ciertas condiciones de forma paralela en el sistema BD MAX y en LightCycler. Las condiciones a comparar consistieron en un tiempo de incubación de 45 minutos, con una concentración de cisplatino de 350 $\mu\text{g/ml}$, y con una temperatura de incubación de 37 °C. El uso de esta temperatura se basó en el hecho de que el cisplatino tiene un uso como agente quimioterápico en humanos inyectándose en sangre, y por tanto está actuando a temperatura corporal.

Finalmente, se probó en el sistema BD MAX un aumento de la concentración a 700 $\mu\text{g/ml}$ manteniendo el tiempo (45 minutos) y la temperatura de incubación (37°C). Estas condiciones son las que finalmente se adoptaron para el protocolo. Los detalles de los distintos pasos del protocolo usando estas condiciones se explican en los siguientes apartados.

Cuando hablamos de concentración de cisplatino, nos referimos siempre a concentración de tratamiento final. Es decir, la resultante tras añadir el volumen de cisplatino a la muestra con bacterias.

3.4.8 Pruebas de tratamiento con oxaliplatino

Tras los ensayos realizados con el cisplatino se decidió probar otro compuesto derivado del mismo. En los ensayos con el oxaliplatino se usaron algunas de las condiciones de trabajo usadas con el cisplatino usando los mismos pasos.

3.4.9 Protocolo de tratamiento con cisplatino usando centrifugación

Una vez establecidas las condiciones del ensayo, el proceso completo de detección selectiva de bacterias vivas sería el siguiente:

A partir de la bacteria crecida en placa (SARM ATCC 43300), se preparó una solución 0,5 McFarland en agua, que luego se ajustó haciendo una dilución 1/100 a una concentración aproximada de $1\text{E}4$ cfu/ml. Esta solución bacteriana fue dividida en dos, y una de esas partes se sometió a un shock térmico poniéndola en un baño a 80°C durante 3 minutos para conseguir el grupo de bacterias muertas, pasándolas a continuación a hielo unos minutos para atemperar la solución y evitar un deterioro excesivo por acción del calor. La otra porción de la solución bacteriana serán las bacterias vivas. Hicimos una

siembra en placa de agar sangre tanto de bacterias vivas (10 µl) como de las muertas (100 µl) para comprobar si realmente había o no crecimiento, respectivamente. A continuación, y para cada una de las dos soluciones, se transfirió 1 ml de bacterias a dos tubos nuevos, obteniendo así dos muestras por cada una de las soluciones bacterianas: una de ellas a modo de control sólo con bacterias, y el otro con bacterias a las que se le añadirá cisplatino para ser tratadas.

Una vez preparadas las muestras, necesitamos preparar una solución de cisplatino a una concentración adecuada para el tratamiento posterior. La muestra y el cisplatino se mezclarán en volúmenes iguales, por lo que el cisplatino se preparó al doble de concentración de la requerida para el tratamiento. Por eso se preparó el cisplatino a una concentración de 1.400 µg/ml. Tanto para resuspender como para preparar las diluciones de cisplatino se debe usar solución salina al 0,9% de cloruro sódico. Una vez listo el cisplatino, se añadió 1 ml sólo en los tubos de las muestras que iban a ser tratadas, dejando a su par correspondiente sin cisplatino para usarlo como control. Una vez añadido el cisplatino, mezclamos por inversión varias veces e incubamos en estufa a 37°C durante 45 minutos en un agitador orbital. Aquellos tubos que no llevan cisplatino también se sometieron a esta incubación, y siguieron el mismo proceso que los otros en todo momento.

Tras la incubación, para eliminar los restos de la solución de cisplatino y evitar su interferencia en la detección, se centrifugaron los tubos a 12.000 rcf durante 5 minutos, descartando después el sobrenadante y lavando en 1 ml de agua. A continuación, volvimos a centrifugar a 12.000 rcf durante 5 minutos, eliminando posteriormente el sobrenadante y recuperando en 1 ml de agua. Estas centrifugaciones se hicieron a todas las muestras, las tratadas y las no tratadas con cisplatino.

Una vez recuperadas las muestras, ya se puede realizar la extracción de ácidos nucleicos para poder hacer la detección por PCR a tiempo real. Este proceso se llevó a cabo en dos sistemas distintos, bien de forma individual o de forma simultánea en ambos. Para continuar con el sistema automático BD MAX fue necesario transferir 200 µl de nuestra solución al tubo de muestra del kit de extracción, mezclar por vorteador, colocar los reactivos de extracción y de PCR del kit en la tira de reacción, e introducirlo todo en el sistema. En este, todo el proceso se llevó a cabo de forma automatizada sin necesidad de más manipulación hasta el momento de la visualización del resultado final. Cuando el proceso se continúa haciendo con el sistema automático de extracción MagNA Pure, se necesitó traspasar 400 µl de la muestra a un tubo de muestra vacío que se situará en el sistema junto con el resto de reactivos para la extracción. Una vez acabada la esta, se recuperó el eluido (200 µl), y se usaron 50 µl con 50 µl del reactivo del kit de PCR a tiempo real SeptiFast para realizar la amplificación en el termociclador LightCycler.

3.4.10 Mezcla de bacterias vías y muertas (VM)

Para comprobar el funcionamiento del protocolo en una mezcla heterogénea, se realizó el mismo tratamiento pero a una muestra compuesta por la mezcla de bacterias vivas y muertas. Las soluciones bacterianas se prepararon en la misma concentración y del mismo modo que en el protocolo ya citado, y luego se mezclaron en volúmenes iguales para constituir la muestra de trabajo. El protocolo se llevó a cabo de la forma habitual, sometiendo al tratamiento con cisplatino sólo a uno de los duplicados de la muestra, dejando al otro como control.

3.4.11 Protocolo de tratamiento con cisplatino en sangre usando centrifugaciones

Para probar el efecto del tratamiento en una muestra real, se usó sangre de pacientes sanos, a la que se le añadió bacterias para asemejarla a una muestra clínica de un paciente con sepsis. Como se menciona a continuación, las bacterias en sangre se intentaron recuperar por centrifugación previamente al tratamiento con cisplatino, ya que esta muestra afinidad para unirse a proteínas, además de poder interactuar con la fracción celular de la sangre, lo que haría difícil controlar las condiciones del tratamiento para realizar el test.

A partir de la bacteria crecida en placa se preparó una solución 0,5 McFarland. A partir de esta, se tomó parte de la solución y se sometió a un shock térmico en un baño a 80 °C durante 3 minutos para conseguir las bacterias muertas necesarias para la prueba, y se pasaron inmediatamente a hielo para atemperar la solución. A partir de las dos soluciones que obtuvimos ahora (bacterias vivas y muertas), se hizo una dilución directamente en sangre para conseguir una concentración aproximada de 1E4 cfu/ml para cada una. La sangre con bacterias se dejó entre 5-10 minutos en agitación a temperatura ambiente para que se mezclasen las bacterias en la totalidad de la muestra. A continuación, cada muestra se dividió en dos para que, a la hora del tratamiento con cisplatino, añadirse solamente a uno de los tubos de cada grupo (a un tubo con bacterias vivas y a un tubo con bacterias muertas). Así nos quedamos con un duplicado que servirá como control para cada grupo. Además, se usó también una porción de la sangre sin bacterias que se usó como blanco. Tanto para la sangre con bacterias como para el blanco, el volumen total fue de 1 ml. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 150 rcf durante 5 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. Estos se centrifugaron a 20.000 rcf durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante, se resuspendieron en 1 ml de agua y se centrifugaron de nuevo (20.000 rcf, 2 minutos). A continuación se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de agua. Una vez recuperadas las muestras, añadimos 1 ml de cisplatino a 1.400 µg/ml a uno de los duplicados de bacterias vivas y de bacterias muertas, y al otro duplicado y al blanco se les añadió 1 ml de agua para completar el volumen. Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 45 minutos en un agitador orbital. Al finalizar la incubación, las muestras se

centrifugaron a 12.000 rcf durante dos minutos, se eliminó el sobrenadante, y se resuspendieron en 1 ml de agua. Repetimos este paso y ya obtuvimos la muestra final lista para el proceso de extracción y detección. En este punto, podemos usar la muestra para extraer sólo en uno de los sistemas o por ambos a la vez. Para llevar a cabo la extracción y detección en el sistema BD MAX, se necesita poner 200 µl de muestra en el tubo de extracción con tampón, preparar los reactivos de extracción y de PCR a tiempo real del kit, y lanzar el experimento. Para el sistema MagNA Pure se usan 400 µL de la muestra, y posteriormente 50 µL del ADN extraído para la PRC en el sistema LightCycler.

3.5 NANOPARTÍCULAS Y VIABILIDAD (TEST DE VIABILIDAD)

3.5.1 Captura de bacterias muertas

Para asegurar la utilidad de las nanopartículas para la captura no sólo de bacterias vivas, se realizaron pruebas de captura en el mismo modo que previamente se probara para determinar la captura con distintos microorganismo vivos. De este modo garantizaríamos la utilidad para la detección en el protocolo de viabilidad.

El procedimiento consistió en preparar una solución bacteriana en agua a una concentración teórica de 1E4 cfu/ml con la cepa de referencia ya usada (*S. aureus* ATCC 43300). Parte de esta solución se introdujo en un baño a 80 °C durante 3 minutos y se pasó a hielo para atemperar. Tanto la bacteria viva como la muerta se sembraron en placa de agar sangre para estimar la cantidad aproximada de colonias usadas, así como para comprobar la ausencia de crecimiento, respectivamente. En el caso de las vivas se sembraron 10 µl, y 100 µl en el caso de las muertas, y se incubaron a 37 °C. Con ambas partículas (NANO MR y ApoH) se siguió el mismo procedimiento de separación indicado en los apartados anteriores y usando el sistema automático BD MAX con el kit de detección MRSA XT para la detección por PCR a tiempo real.

3.5.2 Sistema automático usado en los ensayos con partículas

Para llevar a cabo los ensayos del test de viabilidad usando nanopartículas magnéticas, y a pesar de que en ambos sistemas la extracción de ácidos nucleicos y su detección se mostró compatible con el uso de ambas, finalmente se optó por llevarlos a cabo únicamente en el sistema BD MAX con el kit de detección MRSA XT. Esta decisión fue basada en los resultados de los experimentos previos y en la facilidad de manejo de este sistema, por integrar de forma automática en un mismo aparato la fase de extracción y de amplificación.

3.5.3 Protocolo viabilidad en solución con las nanopartículas de NANO MR

Para llevar a cabo las pruebas se siguió el mismo protocolo ya descrito, pero cambiando las centrifugaciones de recuperación de bacterias y de lavado del cisplatino por el uso de nanopartículas magnéticas de unión específica a microorganismos.

A partir de la bacteria crecida en placa (*S. aureus* ATCC 43300), se preparó una solución 0,5 McFarland en agua que luego se ajustó a una concentración aproximada de 1×10^4 cfu/ml. Esta solución bacteriana fue dividida en dos, y una de esas partes la sometimos a un shock térmico poniéndola en un baño a 80°C durante 3 minutos para conseguir el grupo de bacterias muertas, pasándolas a continuación a hielo unos minutos para atemperar la solución y evitar un deterioro excesivo por acción del calor. La otra porción de la solución bacteriana serán las bacterias vivas. Hicimos una siembra en placa de agar sangre tanto de bacterias vivas (10 μ l) como de las muertas (100 μ l) para comprobar si realmente había o no crecimiento respectivamente. A continuación, y para cada una de las dos soluciones, se pasó 1 ml o 500 μ l (partículas NANO MR y ApoH, respectivamente) de bacterias a dos tubos nuevos, obteniendo así dos muestras por cada una de las soluciones bacterianas: una de ellas a modo de control sólo con bacterias, y el otro con bacterias a las que se le añadirá cisplatino para ser tratadas en pasos posteriores. En este punto es donde preparamos cada una de las nanopartículas para poder añadirlas a las soluciones bacterianas para recuperar las bacterias.

Las partículas de NANO MR se proporcionan en forma de esfera sólida, por lo que es necesario resuspenderlas con 10 ml de un tampón de unión propio del kit. Una vez en modo líquido, se añadió 1 ml de partículas en cada tubo con 1 ml de bacterias. A continuación se incubaron a 37 °C durante 35 minutos en un agitador orbital para garantizar que las partículas se mezclasen continuamente a través de toda la muestra. Al finalizar la incubación, los tubos se pusieron en un imán durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se retiró el líquido. Se añadieron 2 ml de tampón de lavado, se resuspendieron de nuevo las partículas, y se situaron otra vez los tubos 5 minutos en el imán. Este paso se repitió una vez más, y finalmente eliminamos el líquido, recuperando las partículas en 1 ml de agua.

Una vez recuperadas las partículas con las bacterias unidas, se sembraron 10 μ l de cada tubo para comprobar que seguía habiendo crecimiento o no, según correspondiese.

Cuando se recuperan las bacterias unidas a las partículas ya se le puede añadir el cisplatino preparado a 1.400 μ g/ml sólo a uno de los duplicados de cada grupo de muestras (vivas y muertas). Añadimos 1 ml de cisplatino sobre 1 ml de muestra recuperada con las partículas. A los duplicados que no se les añadió cisplatino se les añadió igual volumen de agua. Se mezclaron bien y se incubaronn todas las muestras a 37 °C durante 45 minutos con agitación continua en un agitador orbital. Tras la incubación, se pusieron todas las muestras en el imán durante 10 minutos a temperatura

ambiente, se retiró el líquido y se lavó con 2 mL de tampón de lavado. Las muestras se pusieron de nuevo en el imán haciendo dos lavados con incubaciones de 5 minutos. Al final, se eliminó el líquido y se recuperaron en 1 ml de agua. Esta ya sería la muestra final que se introduciría en el sistema automático para la extracción de ácidos nucleicos y para la detección por PCR a tiempo real.

3.5.4 Protocolo de viabilidad en solución con las nanopartículas ApoH

Para llevar a cabo las pruebas se siguió el mismo protocolo ya descrito pero cambiando las centrifugaciones de recuperación de bacterias y de lavado del cisplatino por el uso de nanopartículas magnéticas de unión específica a microorganismos.

A partir de la bacteria crecida en placa (*S. aureus* ATCC 43300), se preparó una solución 0,5 McFarland en agua que luego se ajustó a una concentración aproximada de 1×10^4 cfu/ml. Esta solución bacteriana fue dividida en dos, y una de esas partes se sometió a un shock térmico poniéndola en un baño a 80 °C durante 3 minutos para conseguir el grupo de bacterias muertas, pasándolas a continuación a hielo unos minutos para atemperar la solución y evitar un deterioro excesivo por acción del calor. La otra porción de la solución bacteriana eran las bacterias vivas. Hicimos una siembra en placa de agar sangre tanto de bacterias vivas (10 µl) como de las muertas (100 µl) para comprobar si realmente había o no crecimiento, respectivamente. A continuación, y para cada una de las dos soluciones, se pasaron 500 µl de bacterias a dos tubos nuevos, obteniendo así dos muestras por cada una de las soluciones bacterianas: una de ellas a modo de control sólo con bacterias, y el otro con bacterias a las que se le añadirá cisplatino para ser tratadas en pasos posteriores.

Las partículas ApoH se proporcionan en solución listas para usar. Antes de añadir las a la muestra, es necesario preparar una dilución de un tampón del kit, TTGB 10x, a una concentración de 2x. Este tampón se usará para añadir en igual volumen a la muestra. Como recomienda el fabricante, se añadieron 500 µL del tampón TTGB 2x sobre 500 µL de muestra. A continuación, se añadieron 20 µL de las nanopartículas y se mezclaron bien por inversión de los tubos. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en un agitador orbital para garantizar que las partículas se mezclan continuamente a través de la muestra. Al finalizar la incubación, los tubos se situaron en un imán durante 10 minutos a temperatura ambiente, y luego se retiró el líquido. Se añadió 1 ml de agua, se resuspendió de nuevo las partículas y se pusieron otra vez los tubos 5 minutos en el imán. Este lavado se repitió una vez más. Finalmente se eliminó el líquido y se recuperaron las partículas en 500 µl de agua.

Una vez recuperadas las partículas con las bacterias unidas, se sembraron 10 µl de cada tubo para comprobar que seguía habiendo crecimiento o no, según correspondiese.

Cuando se recuperan las bacterias unidas a las partículas, ya se le puede añadir el cisplatino preparado a 1.400 µg/ml sólo a uno de los duplicados de cada grupo de muestras (vivas y muertas). Añadimos 500 µl de cisplatino sobre 500 µl de muestra recuperada con las partículas. A los duplicados que no se les añade cisplatino se les añade igual volumen de agua. Se mezclan bien y se incuban todas las muestras a 37 °C durante 45 minutos con agitación continua en un agitador orbital. Tras la incubación, se ponen todas las muestras en el imán durante 10 minutos a temperatura ambiente, se retira el líquido y se lavan con 1 ml de agua. Se sitúan nuevamente en el imán haciendo dos lavados con incubaciones 5 minutos, se elimina el líquido y se recuperan en 500 µl de agua. Esta ya sería la muestra final que se introduciría en los sistemas automáticos para la extracción de ácidos nucleicos y para la detección por PCR a tiempo real.

3.5.5 Protocolo de viabilidad en sangre usando nanopartículas

Para llevar a cabo las pruebas se siguió el mismo protocolo de tratamiento ya descrito pero cambiando las centrifugaciones tanto en sangre como en los lavados tras el tratamiento con cisplatino por el uso de nanopartículas magnéticas con especificidad para la unión a microorganismos.

Se siguieron los mismos pasos para obtener tanto las bacterias vivas como las bacterias muertas para el ensayo con la cepa de referencia MRSA ATCC 43300. A partir de estas soluciones bacterianas, y usando sangre obtenida en tubos con EDTA de pacientes sanos como diluyente, se prepararon a una concentración de 1E4 cfu/mL (tanto para bacterias vivas como para bacterias muertas) final en sangre. Este preparado se dejó a temperatura ambiente 5-10 minutos en agitador orbital para la correcta homogenización de la muestra. A partir de aquí se dividió cada muestra en dos, para tener un control y su duplicado que se tratara con el cisplatino.

Para las partículas NANO MR se usó 1 ml de sangre con bacterias, sobre la que se añadió 1 ml de partículas y se incubaron durante 35 minutos a 37 °C en agitador orbital. Al finalizar la incubación se colocaron los tubos en un imán durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se lavó con 2 ml de tampón de lavado proporcionado por el fabricante. A continuación se hicieron dos lavados más con incubación en imán de 5 minutos, recuperando al final las partículas libres de sangre en 1 ml de agua. A esta nueva suspensión de partículas con las bacterias unidas se les añadió 1 ml de cisplatino a 1.400 µg/ ml a uno de los duplicados, al otro 1 ml de agua, y se incuban en agitador orbital durante 45 minutos a 37 °C. Tras la incubación se realizó una nueva separación magnética de las partículas para lavar los restos del cisplatino que puedan interferir en la detección. Los duplicados a los que se les añadió agua también se sometieron a esta separación. El número de incubaciones, tiempos y volúmenes son los mismos que en la separación previamente explicada. Finalmente, con las partículas

recuperadas, se añade 200 μ L de la solución al tubo de muestra con tampón para la extracción en el sistema BD MAX.

Para las partículas ApoH el protocolo es exactamente el mismo, sólo con unos matices de diferencia. Por un lado, el volumen de partida de muestra, que son 500 μ L, a la que se le añade 500 μ L de del tampón proporcionado por la casa comercial a una concentración 2X, y a continuación 20 μ L de las partículas. Por otro lado, la incubación para la recuperación de las partículas se lleva a cabo durante 30 minutos. Además, en los lavados no se usa ningún tampón proporcionado por la casa comercial, si no agua estéril para inyección. Y como el volumen de muestra inicial son 500 μ L, este es el mismo volumen en el que se recuperan las partículas en los pasos correspondientes, además de ser el volumen de cisplatino que se añade a la muestra para el tratamiento. El paso final consiste, al igual que en las otras partículas, en añadir 200 μ L de las partículas finales recuperadas al tubo de muestra para la extracción y detección en el sistema BD MAX.

3.6 ENSAYO SOBRE BACTERIAS MUERTAS POR TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

Una vez encontrada la molécula adecuada de unión al ADN, con los parámetros básicos para los ensayos establecidos y con la ayuda de las nanopartículas para poder trabajar a partir de una muestra compleja como la sangre, el paso siguiente que faltaba por comprobar era ver si seríamos capaces de conseguir el mismo efecto de inhibición de la amplificación sobre bacterias muertas debido a un tratamiento antibiótico. Para ello elegimos la daptomicina, antibiótico activo frente a bacterias gram positivas, y con un mecanismo de acción basado en la unión (en presencia de iones de calcio(264)) a las membranas bacterianas causando una despolarización (alteración de la permeabilidad) y conduciendo a una rápida inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN (265, 266). Este efecto dañino inicial sobre las membranas fue el motivo de elección ya que, al igual que en las bacterias muertas por calor en nuestros experimentos, provocaría la aparición de huecos en la membrana que permitirían la entrada del cisplatino.

A modo de estudio preliminar, lo que hicimos fue comparar en paralelo el efecto del tratamiento con cisplatino sobre: (a) bacterias muertas por calor, y (b) bacterias muertas por acción antibiótica. Además se introdujo en el experimento bacterias vivas que actuarían como control. Los tres grupos de bacterias del experimento se hicieron por duplicado para tener un control no sometido a tratamiento y una muestra sometida al tratamiento con cisplatino.

Las soluciones bacterianas se prepararon del mismo modo ya indicado en el protocolo general del test de viabilidad, mientras que el nuevo grupo de bacterias muertas se obtuvo mezclándolas con una solución de daptomicina (Cubicin 350 mg. Novartis lot. cdf058d) durante 18-24 horas a 37 °C. La daptomicina se preparó a una concentración de

200 µg/ml en solución salina al 0,9%. Además, se añadió Ca^{+} a una concentración de 50 µg/ml. Bacterias y daptomicina se añadieron en volúmenes iguales y se incubaron de la forma indicada. Las soluciones con bacterias vivas y bacterias muertas por calor se guardaron refrigeradas hasta finalizar la incubación de las bacterias con antibiótico, y empezar así con el protocolo de tratamiento con cisplatino. Para el ensayo también se usó la cepa de referencia ATCC 43300 correspondiente a un *S. aureus* resistente a meticilina.

Finalmente, la extracción de ácidos nucleicos y la detección se realizó en el sistema automático BD MAX con el kit de detección MRSA XT.





4. RESULTADOS





4.1 NANOPARTÍCULAS Y EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ADSORCIÓN INESPECÍFICA)

4.1.1 Valoración inicial del rendimiento con el sistema comercial HAMILTON kPCR (SIEMENS)

Tras las extracciones realizadas con las mezclas de plásmidos, nos encontramos con que en las concentraciones elevadas de nuestras series es donde el sistema parece tener un menor rendimiento y posiblemente se sature la capacidad de unión de las partículas, tanto por su propio tamaño como por la concentración a la que se encuentran. Aún así, se ve una rápida subida en el rendimiento del ADN recuperado que en algunos de los puntos alcanzó valores entre el 18 y 20 %. De todos modos, en la Tabla 7 se muestran de forma resumida los valores medios de los resultados obtenidos en los ensayos.

| µg totales de inicio | µg totales de recuperados | Rendimiento (%) |
|----------------------|---------------------------|-----------------|
| 212 | 1,866 | 0,88 |
| 86,6 | 1,398 | 1,614 |
| 39,9 | 1,364 | 3,419 |
| 18,140 | 1,015 | 5,595 |
| 8,640 | 0,816 | 9,443 |
| 4,030 | 0,494 | 12,256 |
| 1,907 | 0,305 | 15,998 |
| 0,929 | 0,119 | 12,809 |
| 0,450 | 0,054 | 11,71 |
| 0,222 | 0,029 | 13,140 |
| 0,108 | 0,014 | 13,03 |

Tabla 7: Tabla con un resumen de los valores medios de las cantidades de ADN introducido y recuperado del sistema, así como del rendimiento de esa extracción.

4.1.2 Valoración de nuevas nanopartículas en el sistema HAMILTON kPCR (SIEMENS)

Al realizar las extracciones de ADN plasmídico usando nuestras nanopartículas, y llevar a cabo las mediciones y estimar las concentraciones de ADN recuperado y el porcentaje recuperado para calcular el rendimiento, nos encontramos con unos porcentajes muy bajos de recuperación. De hecho, con muchas de las partículas estos se mueven por valores inferiores al 0,1 % incluso en los puntos de concentraciones más elevada, aunque con una tendencia a mejorar a medida que disminuía la cantidad inicial de ADN en la muestra. De todas las partículas mencionadas, solamente las FeO-2206 destacan con unos valores mayores, que se sitúan en torno al 6% (de valor medio en los

mejores casos), cuando nos fijamos en aquellas muestras con menos cantidad de ADN de partida. En las siguientes figuras se muestra la representación gráfica de los resultados de las partículas FeO-2206, FeO-2202 y FeO-2204. En la Figura 24 se puede ver una gráfica comparativa entre las tres partículas donde se ve una clara diferencia en la cantidad total de ADN recuperada, sobre todo en los puntos iniciales que corresponden a las muestras de partida con más cantidad inicial de ADN. Algo similar podemos ver fijándonos en la Figura 25, donde se representan los valores medios del rendimiento en la extracción (porcentaje extraído) de cada una de las partículas. Se puede ver nuevamente el mejor funcionamiento de las partículas 2206 respecto a las otras, y mostrando los mejores porcentajes de recuperación en condiciones de poca cantidad de ADN de partida.

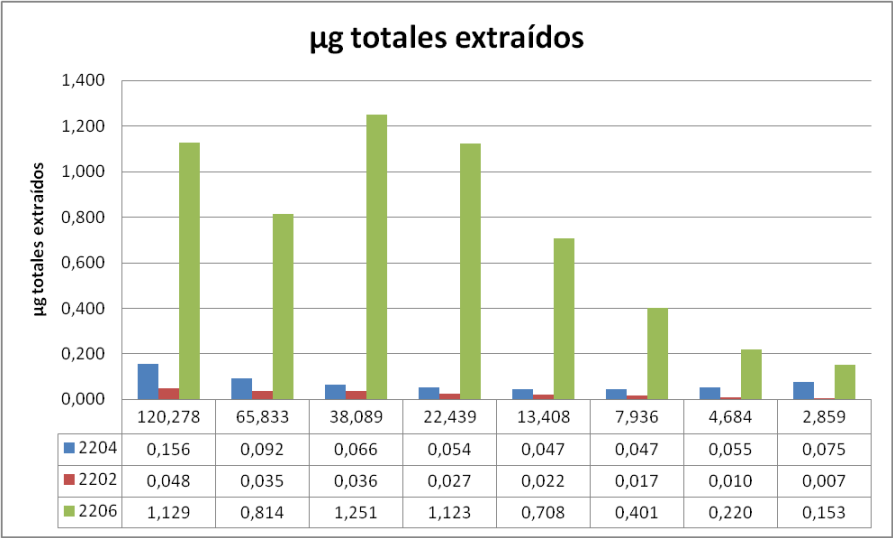


Figura 24: Comparativa de la cantidad total de ADN recuperado en µg totales entre las tres partículas. Los valores debajo de cada grupo de barras se corresponden con las cantidades totales iniciales (valores medios) de ADN en µg introducidas en el sistema en orden decreciente.

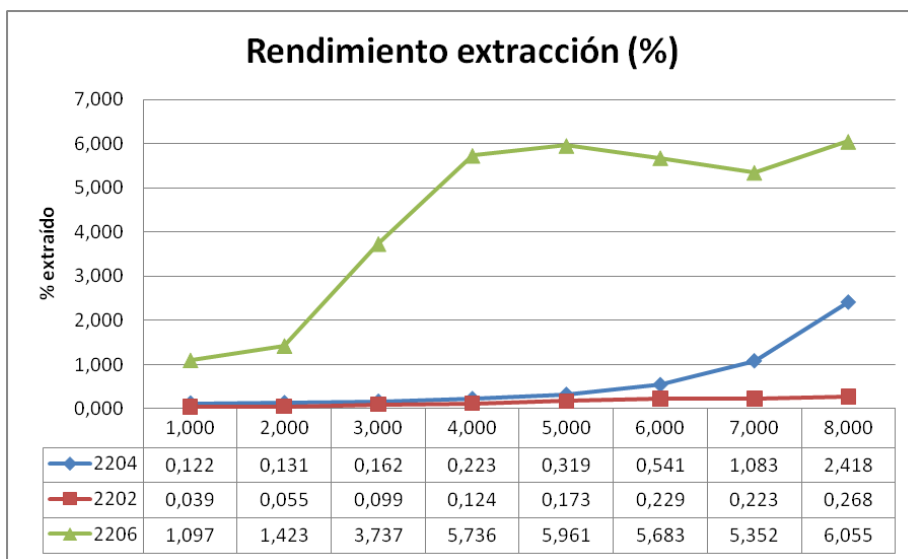


Figura 25: Comparativa del rendimiento global de la extracción (%) de ADN para las tres partículas.

Las otras partículas, FeO-2206-APS, FeO-2207 y FeO-2207-APS, muestran valores aún más bajos (por debajo de 0,1% de recuperación), por lo que no se muestran en la gráfica ya que no aportan más información y las curvas sólo se superpondrían como ya lo hacen las mostradas en el gráfico.

4.1.3 Comparativa con la medida de referencia en el HAMILTON kPCR

Como la única partícula con resultados susceptibles de ser válidos y comparables fue la FeO-2206, es esta la única que usaremos para comparar con las pruebas iniciales realizadas con el sistema HAMILTON kPCR tomado como referencia. En la Figura 26 podemos ver como a la hora de comparar el total de ADN extraído, las partículas 2206 parecen ser ligeramente inferiores en su capacidad de recuperación mientras que esa capacidad se iguala en algunos puntos, y en otros hasta parece mejorar cuando nos fijamos en los puntos finales correspondientes a menores cantidades de ADN de inicio. De todos modos, si nos fijamos en los valores numéricos en la parte baja del gráfico, nos encontramos con una relación bastante pareja entre el sistema original y el uso de las partículas 2206.

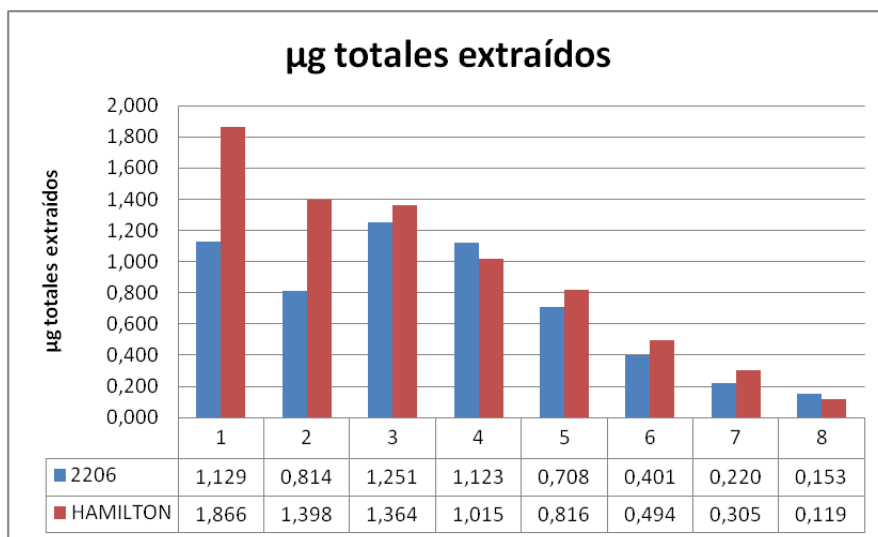


Figura 26: Comparación de los valores de ADN total extraído por el sistema HAMILTON kPCR usando sus propias partículas con el uso de las partículas 2206. Desde el punto uno al ocho se representa la cantidad inicial de ADN en orden decreciente.

4.1.4 Funcionalización de las partículas

Las partículas funcionalizadas con APS con el objetivo de mejorar la unión del ADN y mejorar la recuperación se llevó a cabo con las dos partículas ya descritas y denominadas como FeO-2206-APS y FeO-2207-APS. La principal diferencia en el diseño de estas partículas radica en las dimensiones del núcleo de magnetita, ya que en la FeO-2207-APS tiene casi el doble de diámetro.

Como ya se mencionó en el punto anterior, no se consiguió realizar extracciones con una cantidad de ADN destacable, volviendo a encontrar valores por debajo del 0,1 % en el caso de las FeO-2206-APS, e incluso llegando a puntos sin detección de ADN en el caso de las FeO-2207-APS. Por ese motivo no se muestra ninguna gráfica con referencia a ningún dato numérico.

4.2 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE A METICILINA

Tras el primer análisis para los 101 aislados de MRSA con las dos técnicas moleculares (BDMax™ MRSA Assay y LightCycler® MRSA Advanced Test) nos encontramos con resultados distintos entre ambas técnicas. Se obtienen un total de 84 aislados positivos por ambas técnicas, un total de 10 aislados negativos en ambos

sistemas, y un total de 7 aislados fueron positivos en el sistema BD MAX y negativos en el sistema Lightcycler. Todos los aislados negativos se volvieron a repetir con ambas técnicas para confirma los resultados. Además, para intentar explicar estos resultados negativos, se llevaron a cabo dos nuevos tests a estos aislados. Estos dos ensayos fueron el sistema de identificación Vitek®2 y el test de la coagulasa. Los resultados obtenidos mostraron que tres de los aislados que se mantenían como negativos en el reanálisis fueron identificados por el Vitek®2 y el test de la coagulasa como *S. epidermidis*, y por tanto se retiraron del grupo de estudio. Por otro lado, en el reanálisis con las dos técnicas moleculares, otros tres aislados resultaron positivos por el sistema BD MAX, pero se mantuvieron como negativos en el sistema LightCycler. Además, estos tres aislados fueron confirmados como SARM con los resultados obtenidos en el Vitek®2 y con la prueba de la coagulasa.

De este modo, tras el reanálisis de los aislados con resultado discrepante, obtendríamos los siguientes valores. Tendríamos un total de 84 aislados positivos con ambas técnicas moleculares, un total de 4 aislados negativos en ambos sistemas, y un total de 10 aislados positivos en BD MAX y negativos en LightCycler. Un resumen global de estos datos se muestra en la Figura 27.

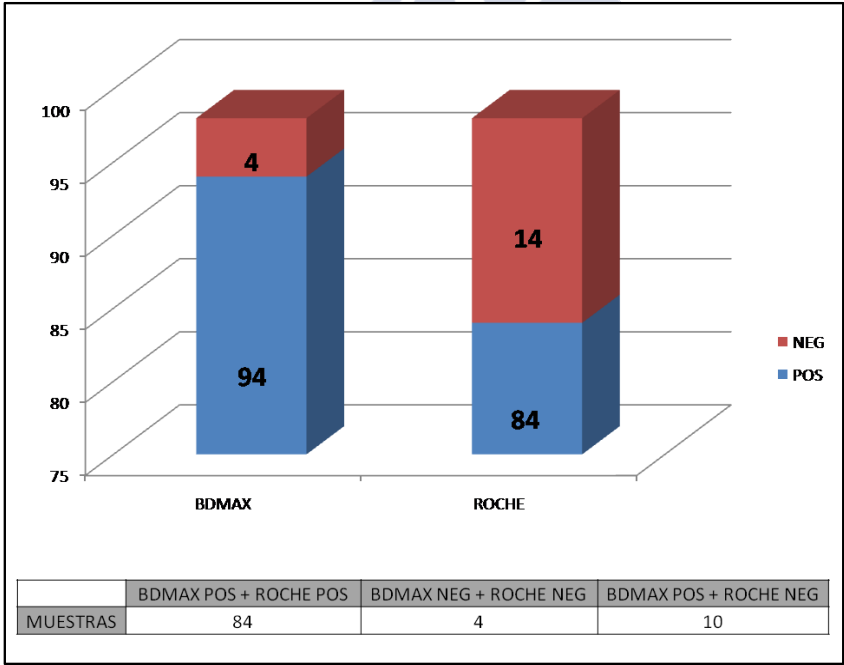


Figura 27: Resultados globales para el análisis de la detección de MRSA usando las técnicas de de los sistemas BD Max y ROCHE.

Como ya se mencionó, se usaron otras técnicas con el objetivo de esclarecer estos resultados negativos obtenidos en ambos sistemas. Por un lado se usó el kit “BD MAX Staph SR” en todos los aislados, negativos y positivos. Lo que nos encontramos es un cambio en el resultado para dos de ellos: uno con resultado positivo con el test “BDMax™ MRSA Assay” resultaría ahora negativo, y uno negativo sería positivo con este nuevo test.

Al mismo tiempo, se realizó el análisis de distancias genómicas usando el ensayo “Diversilab™ Staphylococcus kit” (bioMerieux). Con el uso de esta tecnología fuimos capaces de comparar los diferentes aislados y encontrar una cierta agrupación de los mismos. Como se ve en la Figura 28, los aislados negativos y los positivos usados como controles, están ordenados por proximidad genómica, por patrón electroforético y con valores de proximidad en porcentaje. Al contrario de lo esperado, los grupos de muestras negativas (POS BD MAX/ NEG ROCHE y NEG BD MAX/ NEG ROCHE) aparecen mezcladas dentro de los mismos grupos. De este modo, este análisis no nos permite discriminar diferencias genéticas claras que puedan explicar las discrepancias de resultados entre ambos sistemas, mostrándonos que el BD MAX puede detectar algunas muestras pero no otras con al menos un 95% de homología.

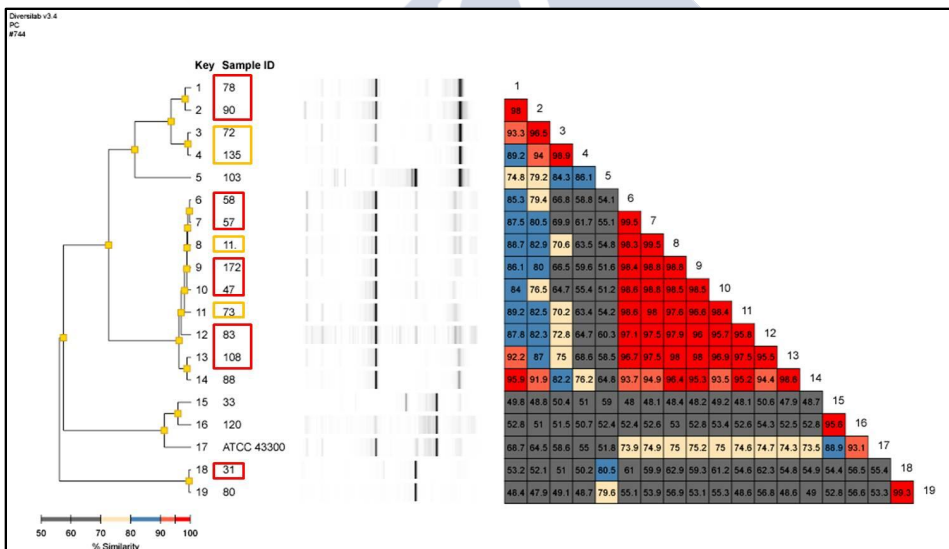


Figura 28: Análisis de distancias genéticas usando rep-PCR obteniendo un dendrograma con los aislados ordenados por similitud genética, por patrón electroforético y con los valores de porcentaje de similitud entre ellas. En cuadros amarillos se muestran los aislados negativos para ambos sistemas. En cuadros rojos los aislados positivos para BD MAX y negativos para Lightcycler. Sin cuadro se muestran muestras positivas por ambos sistemas usadas como controles.

Para obtener más información de estos aislados, se usaron otras dos técnicas moleculares, “GenoType® MRSA test” y “FluoroType® MRSA test” (HAIN Lifescience). Con el ensayo GenoType® MRSA, todas las muestras fueron positivas para el gen *mecA*, a pesar de su resultado negativo con al menos una de las técnicas iniciales. Además, tres de ellas fueron identificadas como SARM adquiridos en la comunidad por la detección del factor PVL. Con el ensayo FluoroType® MRSA solo tres muestras seguían siendo negativas para MRSA.

El análisis realizado mediante la espectrometría de masas identificó a todos los aislados como *S. aureus*, confirmando lo que el resto de ensayos nos indicaban. Cuando se realizó el análisis de los espectros para cada aislado (al menos 20) para obtener un espectro único de referencia, se pudo realizar una comparación de la similitud entre aislados con un dendrograma que nos indicaría las distancias entre ellos. En la Figura 29 se muestra el dendrograma resultante para los aislados discrepantes, donde las diferencias entre ellos se representan por las distancias entre cada rama. Lo que podemos ver claramente es una agrupación de los aislados. Por un lado, los cuatro aislados inicialmente negativos para ambos sistemas se encuentran en la parte superior del dendrograma, claramente separados de los aislados con resultado positivo para BD MAX y negativo para LightCycler. Y ambos grupos separados por la cepa de referencia ATCC 43300 para MRSA. Esto parece indicarnos una cierta diferencia entre los aislados, lo que podría influir a la hora de la detección en cada uno de los ensayos moleculares.

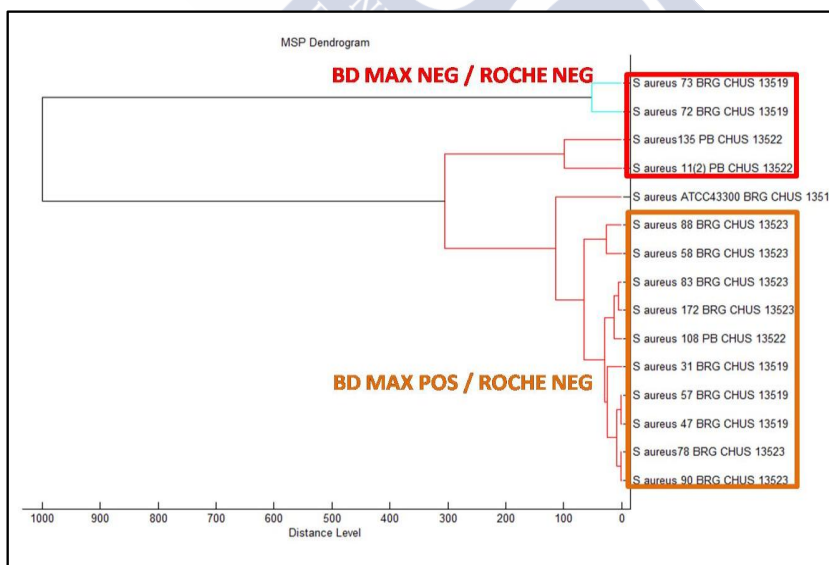


Figura 29: Dendrograma obtenido mediante el análisis de los espectros obtenidos mediante espectrometría de masas donde se ven los dos grupos de aislados con resultado negativo para MRSA claramente separados y agrupados.

Aunque esta información parecía indicar cierta diferencia entre estos aislados, la posibilidad de obtener una caracterización genética más completa que nos pudiese explicar los resultados nos llevó a realizar un tipado basado en un ensayo de PCR para definir el tipo de SCCmec al que pertenece cada uno. Tras el análisis electroforético de los amplificados, nos encontramos con cuatro tipos distintos de SCCmec entre nuestros aislados: 2 de ellos pertenecientes al Tipo V, 2 al Tipo II, 7 al tipo IV y 2 al Tipo III. Además, para dos de los aislados no fue posible asignarles a un tipo concreto tras repetir la PCR. Estos datos se relacionaron con el dendrograma obtenido por el análisis mediante espectrometría de masas para intentar identificar la posible formación de grupos (Figura 30).

En la Tabla 8 se muestra un resumen de los resultados obtenidos para los aislados discrepantes con todas las técnicas usadas.

| MUESTRA | BDMAX MRSA | LightCycler | BDMAX Staph SR | COAGULASA | VITEK | Geno Type MRSA (HAIN) | | | Fluoro Type MRSA (HAIN) |
|---------|------------|-------------|----------------|-----------|-----------------|-----------------------|------|-----|-------------------------|
| | | | | | | S. aureus | mecA | PVL | |
| 31 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (98%) | POS | POS | | POS |
| 47 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (95%) | POS | POS | | POS |
| 57 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (94%) | POS | POS | | POS |
| 58 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (98%) | POS | POS | | POS |
| 78 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (99%) | POS | POS | | POS |
| 83 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (94%) | POS | POS | | POS |
| 88 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (99%) | POS | POS | | NEG |
| 90 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (98%) | POS | POS | | POS |
| 108 | POS | NEG | NEG | POS | S. aureus (98%) | POS | POS | POS | POS |
| 172 | POS | NEG | POS | POS | S. aureus (95%) | POS | POS | | POS |
| 11 | NEG | NEG | POS | POS | S. aureus (95%) | POS | POS | | POS |
| 72 | NEG | NEG | NEG | POS | S. aureus (99%) | POS | POS | POS | NEG |
| 73 | NEG | NEG | NEG | POS | S. aureus (99%) | POS | POS | POS | NEG |
| 135 | NEG | NEG | NEG | POS | S. aureus (99%) | POS | POS | | POS |

Tabla 8: Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de aquellos aislados discrepantes para su asignación como MRSA. En rojo se muestran los aislados que inicialmente fueron positivos para BD MAX y negativos para LightCycler. En amarillo se muestran aquellos que fueron negativos inicialmente con ambos sistemas.

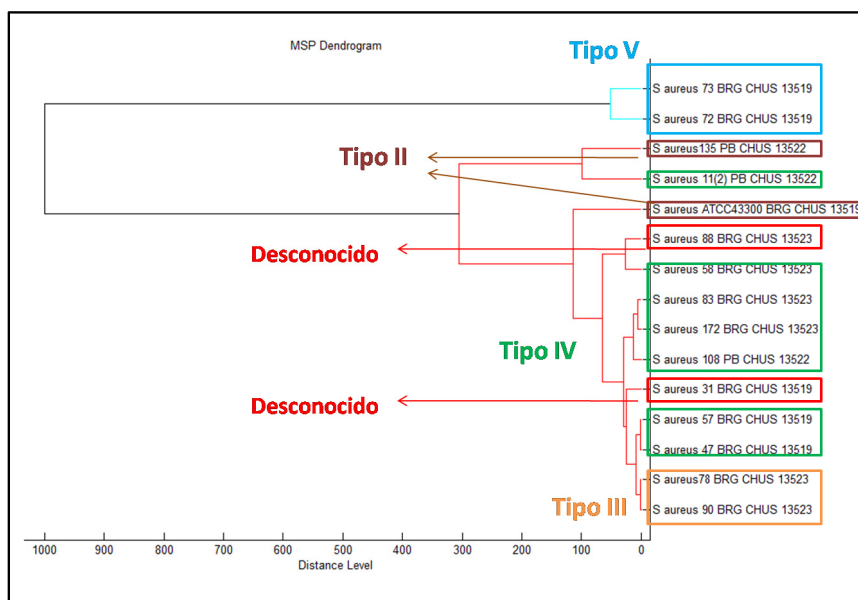


Figura 30: Asignación de los Tipos SCCmec obtenidos mediante PCR para cada aislado sobre el dendrograma obtenido mediante espectrometría de masas.

4.3 DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE ADSORCIÓN ESPECÍFICA CON NANOPARTÍCULAS

4.3.1 Pruebas de captura de microorganismos: partículas NANO MR

Cuando se realizaron las pruebas de captura de microorganismos con estas partículas se observó que, tras introducir la solución final de partículas en el sistema de extracción MagNA Pure y realizar la amplificación en el sistema LightCycler usando el kit de detección SeptiFast, todos los microorganismos usados fueron detectados por PCR a tiempo real en base al análisis de las temperaturas de melting de los amplificadores. Lo único negativo a destacar es el hecho de que para *E. faecium* se obtienen picos de melting siempre muy próximos a la línea base indicando poca señal. Cuando este microorganismo se prueba de forma individual, los resultados se mantienen.

Cuando la prueba fue realizada en el sistema automático BD MAX con el kit de detección MRSA XT, se vio también que la amplificación era positiva para las muestras usadas.

Lo que también se vio con estos resultados fue la compatibilidad de estas partículas de adsorción específica a microorganismos para ser usadas en ambos sistemas automáticos de extracción, también basado en partículas magnéticas, pero de adsorción inespecífica a ácidos nucleicos. Una muestra de los resultados obtenidos se puede ver en

la Figura 31, Figura 32, Figura 33(sistemas MagNA Pure-LightCycler) y Figura 34 (sistema BD MAX).

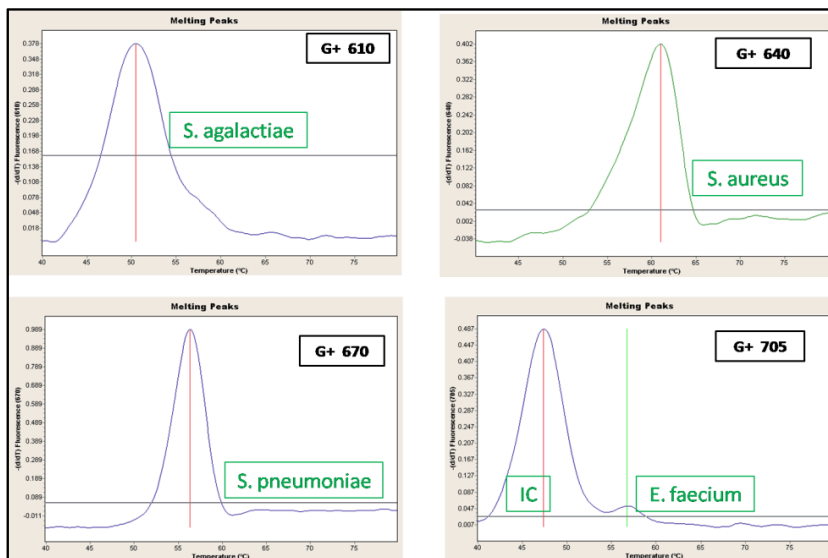


Figura 31: Gráficos del análisis de las temperaturas de melting dadas para el grupo de bacterias gram positivas tras la separación con las nanopartículas NANO MR y la amplificación en LightCycler.

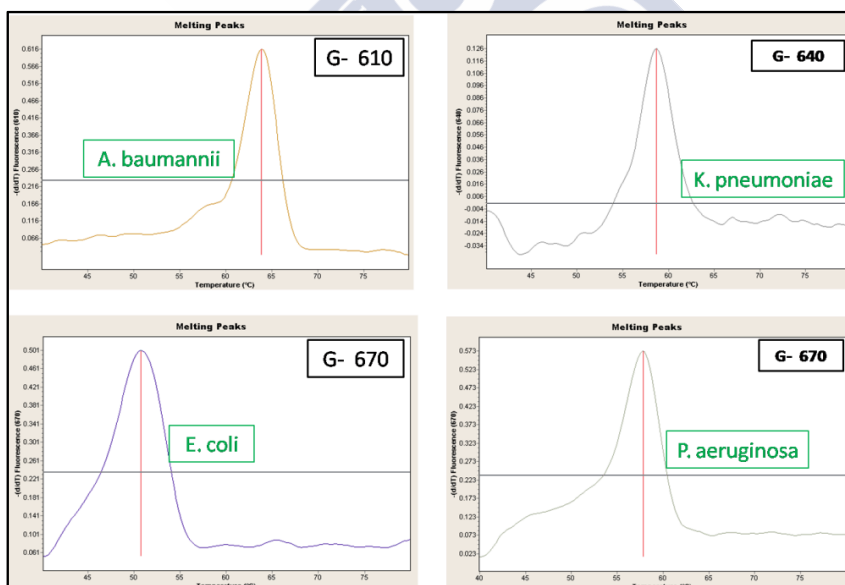


Figura 32: Gráficos del análisis de las temperaturas de melting dadas para el grupo de bacterias gram negativas tras la separación con las nanopartículas NANO MR y la amplificación en LightCycler.

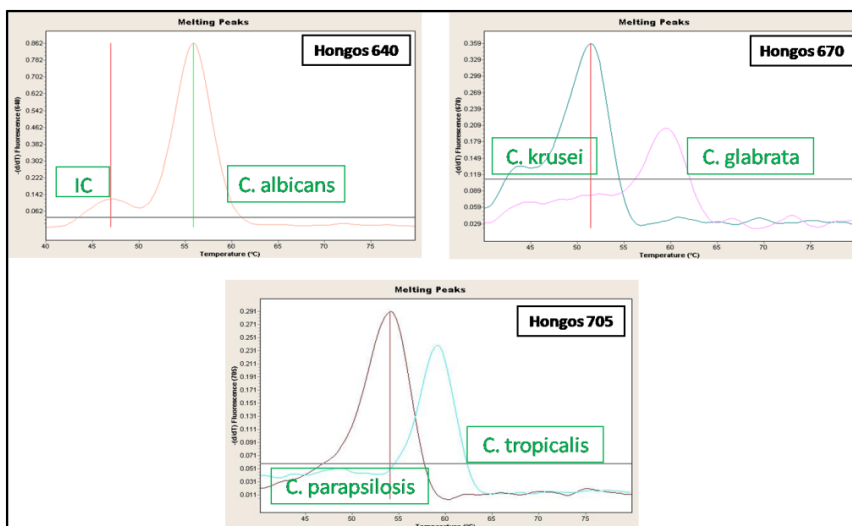


Figura 33: Gráficos del análisis de las temperaturas de melting dadas para el grupo de los hongos tras la separación con las nanopartículas NANO MR y la amplificación en LightCycler.

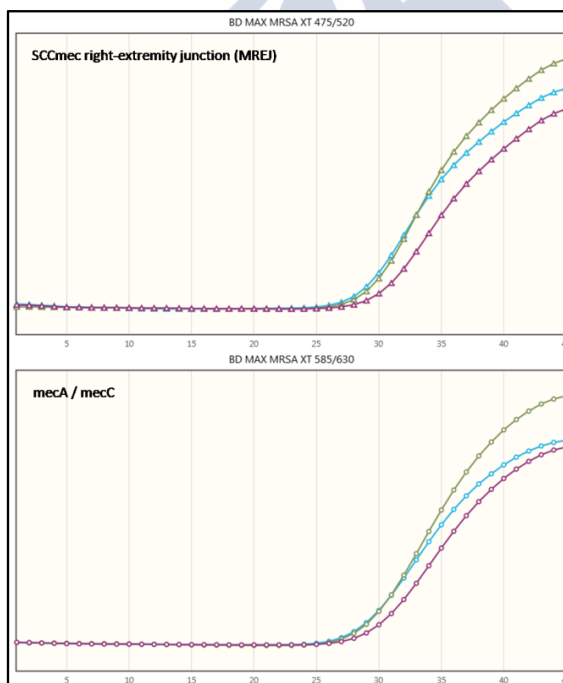


Figura 34: Gráficas de amplificación obtenidas en el sistema BD MAX para las dos dianas de detección del kit MRSA XT tras la separación del MRSA ATCC 43300 con las nanopartículas NANO MR.

4.3.2 Pruebas de Captura de microorganismos: partículas ApoH

Cuando se realizaron las pruebas de captura de microorganismos con estas partículas se observa que, tras introducir la solución final de partículas en el sistema de extracción MagNA Pure y realizar la amplificación en el sistema LightCycler usando el kit de detección SeptiFast, a pesar de mostrar la capacidad de unión y recuperación de microorganismos, estas mostraban problemas principalmente con dos de ellos que no se fue capaz de detectar en la PCR: *E. coli* y *A. baumannii*. También se ve que en la detección de *E. faecium* presenta algún problema, ya que en los análisis de las curvas de melting correspondientes su pico no pasa de la línea base que establece el punto de corte para la detección por el sistema. Cuando estos tres microorganismos se prueban de forma individual, se ve que los resultados se mantienen. Con el resto de microorganismos probados no se presentó ningún problema en la detección.

Cuando la prueba fue realizada en el sistema automático BD MAX con el kit de detección MRSA XT, se vio también que la amplificación era positiva para las muestras usadas.

Al igual que con las otras partículas, lo que también se vio con estos resultados fue la compatibilidad de estas partículas de adsorción específica a microorganismos para ser usadas en ambos sistemas automáticos de extracción, también basados en partículas magnéticas, pero de adsorción inespecífica a ácidos nucleicos. Un resumen de los resultados obtenidos se puede ver en la en los gráficos de la Figura 35, Figura 36, Figura 37 y Figura 38.

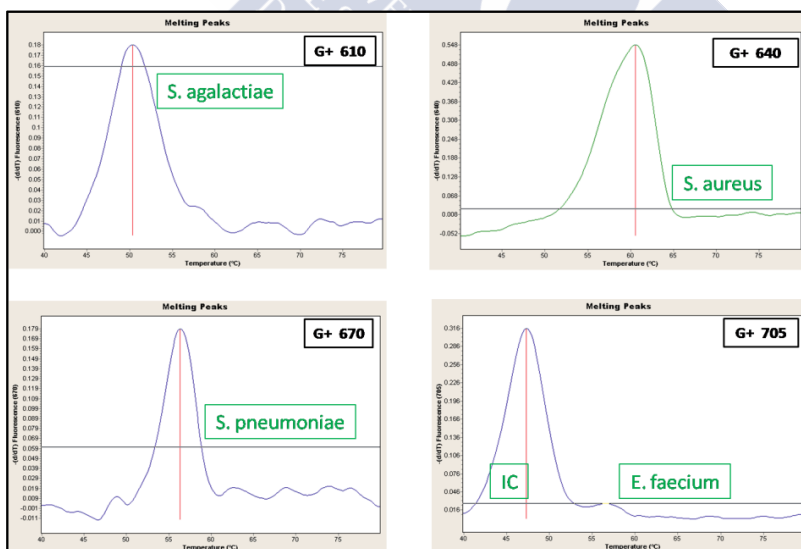


Figura 35: Gráficos del análisis de las temperaturas de melting dadas para el grupo de bacterias gram positivas tras la separación con las nanopartículas ApoH y la amplificación en LightCycler.

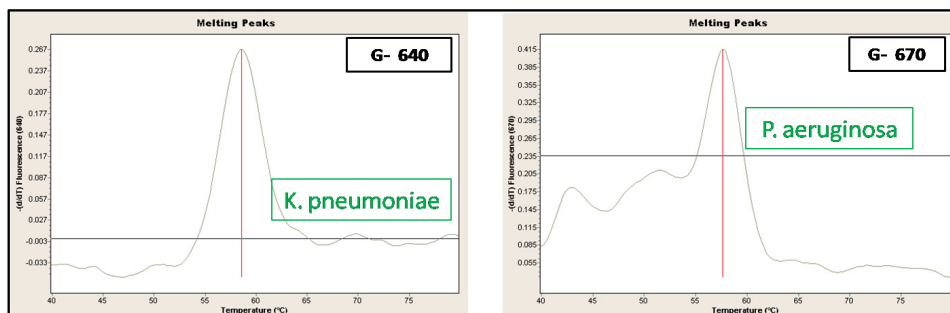


Figura 36: Gráficos del análisis de las temperaturas de melting dadas para el grupo de bacterias gram negativas tras la separación con las nanopartículas ApoH y la amplificación en LightCycler.

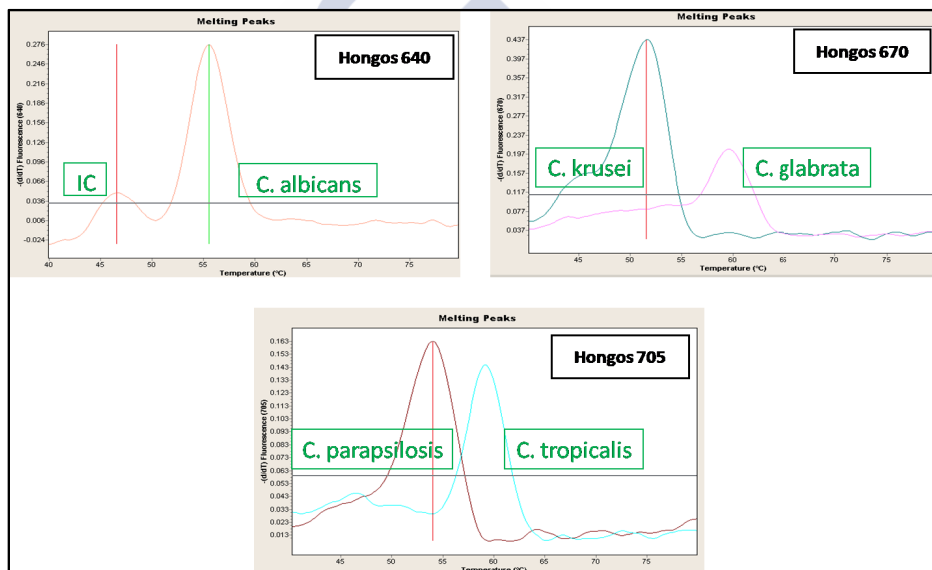


Figura 37: Gráficos del análisis de las temperaturas de melting dadas para el grupo de los hongos tras la separación con las nanopartículas ApoH y la amplificación en LightCycler.

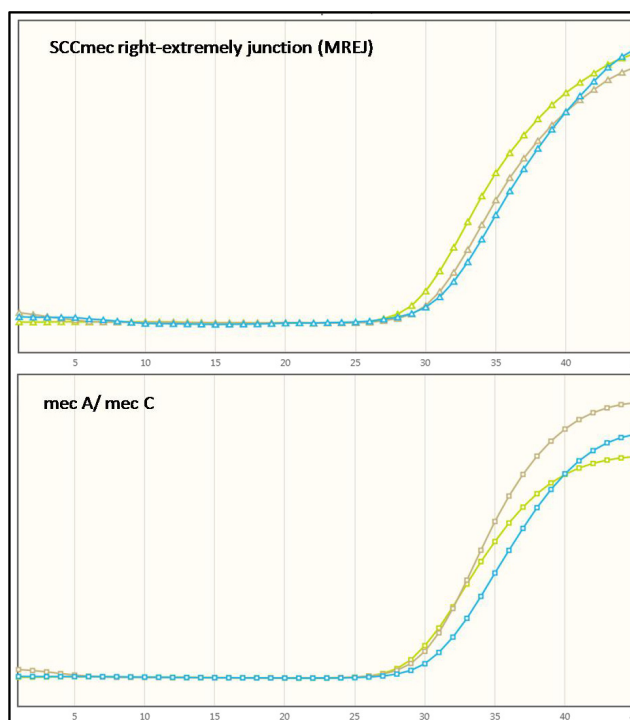


Figura 38: Gráficas de amplificación obtenidas en el sistema BD MAX para las dos dianas de detección del kit MRSA XT tras la separación del MRSA ATCC 43300 con las nanopartículas ApoH.

4.3.3 Recuentos en placa de las soluciones de trabajo

Las soluciones individuales de cada microorganismo que fueron sembradas antes de hacer la mezcla correspondiente mostraron todas un crecimiento positivo, asegurando así la presencia en las muestras de cada uno de ellos, siendo así susceptibles de ser detectados. En la Tabla 9 se muestran los valores medios de los recuentos obtenidos al sembrar 10 μ l de la solución individual de cada bacteria.

| Microorganismo | Volumen Sembrado | Recuento (cfu) | cfu/ml en la solución de partida | Cfu/ml en la solución de trabajo |
|------------------------|------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>S. pneumoniae</i> | 10 µl | 50 | 5000 | 500 |
| <i>S. agalactiae</i> | 10 µl | 120 | 12000 | 1200 |
| <i>E. faecium</i> | 10 µl | 60 | 6000 | 600 |
| <i>S. aureus</i> | 10 µl | 90 | 9000 | 900 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 10 µl | 100 | 10000 | 1000 |
| <i>A. baumannii</i> | 10 µl | 60 | 6000 | 600 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 10 µl | 120 | 12000 | 1200 |
| <i>E. coli</i> | 10 µl | 60 | 6000 | 600 |
| <i>C. albicans</i> | 10 µl | 290 | 29000 | 2900 |
| <i>C. krusei</i> | 10 µl | 175 | 17500 | 1750 |
| <i>C. glabrata</i> | 10 µl | 385 | 38500 | 3850 |
| <i>C. parapsilosis</i> | 10 µl | 210 | 21000 | 2100 |
| <i>C. tropicalis</i> | 10 µl | 175 | 17500 | 1750 |

Tabla 9: Valores de los recuentos en placa de las soluciones de cada microorganismo y cantidades de los mismos en la solución final de trabajo.

4.4 MEJORA DE LA DETECCIÓN MOLECULAR (PCR DE VIABILIDAD)

4.4.1 Pruebas con Monoazida de Etidio (EMA)

Cuando observamos los resultados obtenidos en las muestras que habían sido tratadas con el EMA, no encontramos el efecto inhibitorio esperado sobre las bacterias muertas. Sólo nos encontramos un efecto parcial que, aunque claro, no es suficiente. Además, encontramos también cierto efecto sobre el grupo de las bacterias vivas. Con estos dos datos juntos se concluyó que no era una molécula útil para nosotros.

Si observamos lo que se obtuvo en el sistema LightCycler (Figura 39), nos encontramos solamente con un ligero efecto, pero insuficiente, sobre las bacterias muertas a concentraciones de 1,25 y 5 µg/ml de EMA. Lo que se vio al aumentar la concentración de tratamiento fue una inhibición de la señal tanto en bacterias muertas como en bacterias vivas.

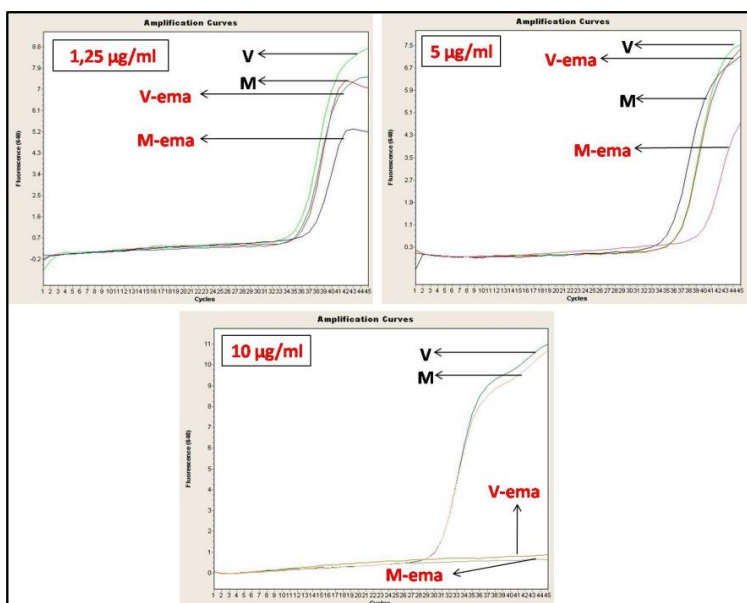


Figura 39: Resumen de resultados de amplificación obtenidos en el sistema LightCycler para distintas concentraciones de tratamiento con EMA.

Al ver los resultados obtenidos en el sistema BD MAX (Figura 40), vemos como al mismo tiempo que se nota un cierto efecto de inhibición sobre las bacterias muertas, reflejado en un atraso claro en el inicio de la amplificación, se nota también el mismo efecto sobre el grupo de bacterias vivas. Y este efecto se acentúa en ambos grupos de bacterias al aumentar al aumentar la concentración de tratamiento con EMA.

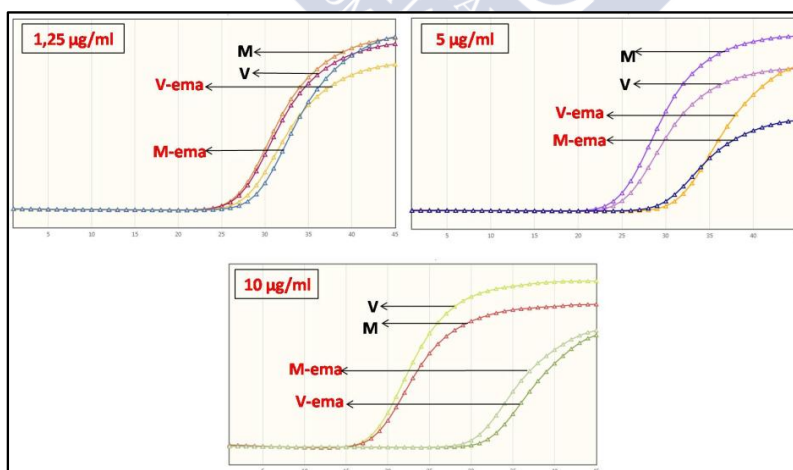


Figura 40: Resumen de resultados de amplificación obtenidos en el sistema BD MAX para distintas concentraciones de tratamiento con EMA.

4.4.2 Prueba de control de cisplatino con ADN libre

Al realizar la prueba de amplificación de ADN libre mezclado con cisplatino, lo que nos encontramos es que ninguna de las muestras que llevan el citostático es amplificada, así como aquellas que llevan únicamente el citostático. Además, se ve que los controles de ADN a los que no se le añadió el cisplatino tienen una amplificación clara. El resultado se puede ver en laFigura 41.

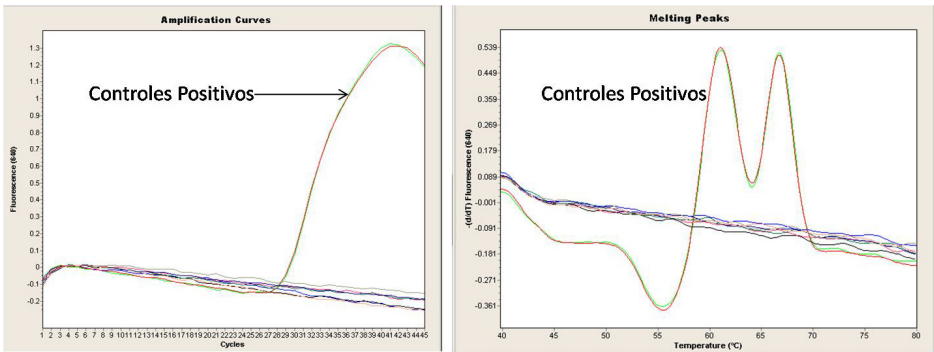


Figura 41: Curvas de amplificación y picos de melting para la prueba de ADN libre mezclado con cisplatino.

4.4.3 Condiciones iniciales de trabajo con cisplatino

Con los primeros ensayos usando cisplatino y en la plataforma LigthCycler nos encontramos con un ligero efecto sobre las bacterias muertas. En la Figura 42 se muestra el resultado de uno de los ensayos, en los que se usó cisplatino con incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos a concentraciones de 200 y 250 µg/ml. En la imagen de la izquierda se muestra el grupo de bacterias vivas (tratadas y no tratadas), donde no se percibe efecto de atraso en las curvas de amplificación. En la imagen de la derecha se puede ver el grupo de bacterias muertas, y como aquellas que fueron tratadas muestran un ligero pero perceptible atraso en el punto de inicio de la amplificación, así como en la altura de las curvas. En la Tabla 10 se muestran los valores numéricos parra los Ct de cada muestra donde se ven los ligeros efectos de retardo en la amplificación de 3 y 4 ciclos en las bacterias muertas tratadas.

| Muestra | Cp | Cp | Muestra |
|---------|-------|-------|---------|
| V | 26.10 | 27.67 | M |
| V200 | 26.43 | 30.69 | M200 |
| V250 | 28.10 | 31.90 | M250 |

Tabla 10: Valores de Ct para las muestras en la prueba con cisplatino a 200 y 250 µg/ml.

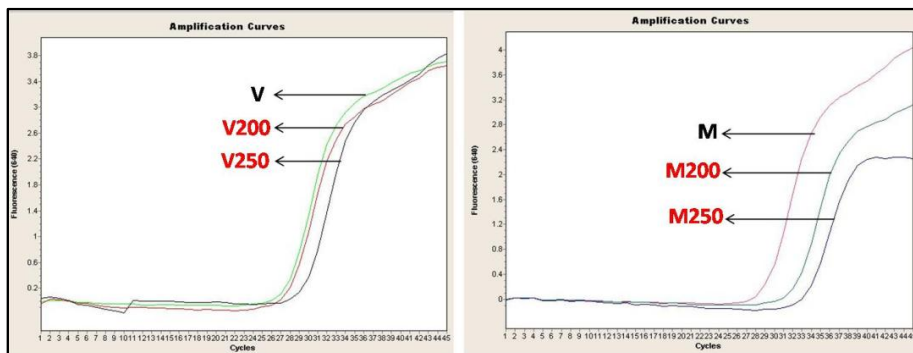


Figura 42: Resultado de las pruebas con cisplatino a 200 y 250 $\mu\text{g/ml}$ durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se muestran en rojo las muestras que fueron tratadas y con el número que indica la concentración de dicho tratamiento. A la izquierda se muestra el grupo de las bacterias vivas. A la derecha se muestra el grupo de las bacterias muertas.

El otro grupo de ensayos buscando la inhibición de la amplificación en bacterias muertas se hizo aumentando la concentración de cisplatino en el tratamiento, así como aumentando el tiempo de incubación del mismo. En la Figura 43 se muestra el resultado del tratamiento con cisplatino a una concentración de 350 $\mu\text{g/ml}$ durante 35 y 45 minutos, a temperatura ambiente. Lo que nos encontramos respecto a las primeras pruebas es que ya se nota un atraso muy evidente en el inicio de la amplificación a ambos tiempos de tratamiento, siendo más intenso para el tratamiento a 45 minutos. En este se ve, además del atraso, una caída muy elevada en la altura de la curva. En la Tabla 11 se muestran los valores de Ct para las muestras, donde nos encontramos con hasta diez ciclos de retardo cuando comparamos las bacterias muertas no tratadas con aquellas bacterias muertas tratadas durante 45 minutos. Lo que vimos también fue un efecto sobre las bacterias vivas tratadas que se manifiesta en torno a los 7 ciclos si comparamos aquellas no tratadas con las tratadas durante 45 minutos.

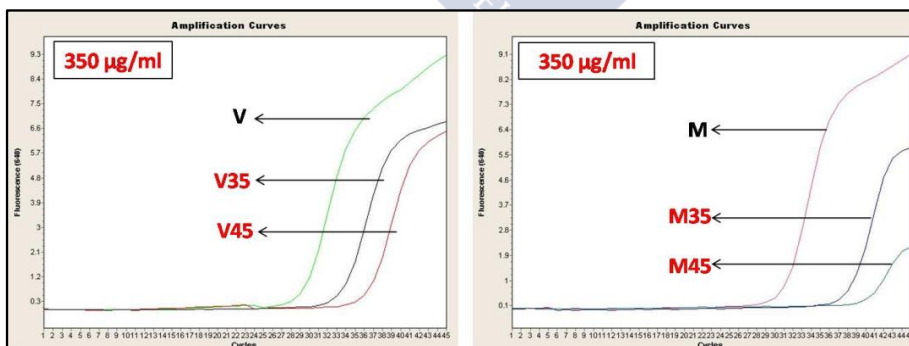


Figura 43: Resultado de las pruebas con cisplatino a una concentración de 350 $\mu\text{g/ml}$. En rojo se muestran las muestras tratadas, indicando con un número el tiempo de tratamiento al que se sometieron. A la izquierda se muestra el grupo de las bacterias vivas. A la derecha se muestra el grupo de las bacterias muertas.

| Muestra | Cp | Cp | Muestra |
|-----------|-------|-------|-----------|
| V | 27.93 | 29.67 | M |
| V350 (35) | 32.11 | 36.38 | M350 (35) |
| V350 (45) | 34.94 | 39.87 | M350 (45) |

Tabla 11: Valores de Ct para las muestras en la prueba con cisplatino a 350 µg/ml durante 35 y 45 minutos.

El siguiente grupo de pruebas se llevó a cabo también en otro sistema de extracción y PCR integrada, el BD MAX. Las condiciones de tratamiento consistían en cisplatino a 350 µg/ml durante 45 minutos, pero pero con incubación en una estufa a una temperatura de 37 °C. En la Figura 44 se muestran los resultados comparados en ambos sistemas. Si nos fijamos en los resultados obtenidos en el LightCycler, vemos como se mantiene sólo un ligero efecto del tratamiento sobre las bacterias muertas, y también como parece atenuarse el efecto inicial visto sobre las bacterias vivas. Si nos fijamos en los resultados obtenidos en el BD MAX, podemos ver como se mantiene el efecto claro sobre las bacterias muertas tratadas manteniendo unos 7 ciclos de retraso respecto al control no tratado, y sin mostrar un efecto significativo en las bacterias vivas.

Aún así, no se consiguió la inhibición en estas condiciones. Las condiciones finales que nos aproximan a ese objetivo son las que se muestran usan en los puntos siguientes, donde la concentración de tratamiento con cisplatino se establece en 750 µg/ml, a 37 °C durante 45 minutos.

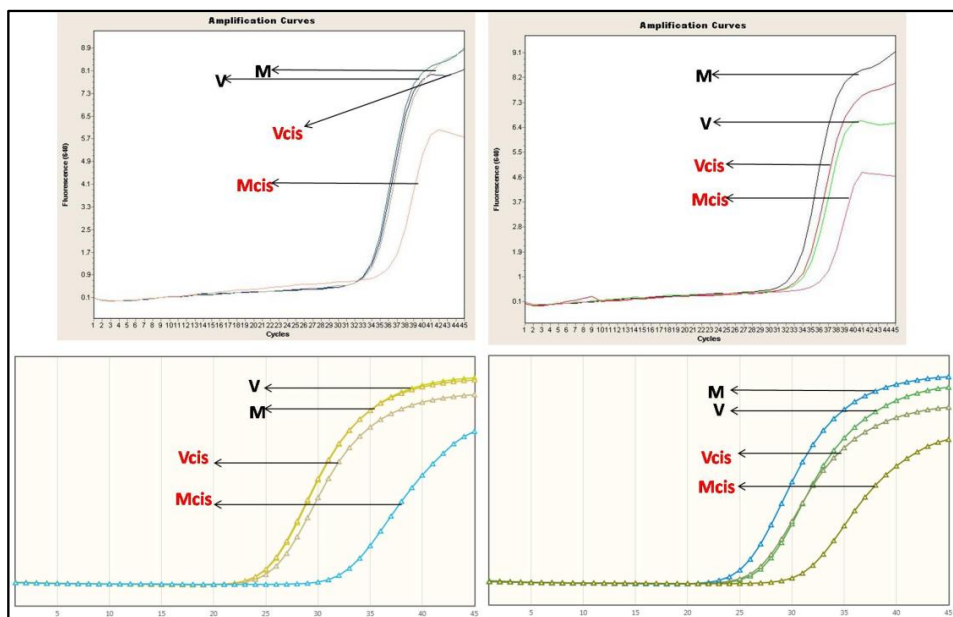


Figura 44: Resultados para el tratamiento con cisplatino a 350 $\mu\text{g/ml}$ durante 45 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. En la parte superior se muestran los resultados obtenidos en el sistema LightCycler. En la parte inferior se muestran los resultados para el sistema BD MAX.

4.4.4 Prueba de viabilidad usando centrifugaciones

Una vez comprobado el efecto inhibitorio del cisplatino y las condiciones óptimas para el tratamiento de las muestras, se realizaron nuevas pruebas para garantizar los resultados del protocolo de tratamiento previo a la detección. Estas condiciones consisten en el tratamiento con cisplatino a 750 $\mu\text{g/ml}$, durante 45 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Como se menciona anteriormente, las pruebas se realizan a partir de una solución bacteriana. Como se muestra en la Figura 45 y la Figura 46, vemos que con el tratamiento que realizamos con cisplatino conseguimos la inhibición completa en la amplificación de las bacterias muertas en la mayoría de los casos. Mientras, en el resto, se consigue un atraso claramente significativo en su C_t si se compara con el control no tratado, o bien una combinación de atraso en la amplificación con un descenso en la altura de la curva de amplificación. Vemos que sólo usando el sistema BD MAX somos capaces de lograr la inhibición completa en la amplificación de las bacterias muertas tratadas, o al menos un atraso muy significativo en el inicio de la amplificación. Con el sistema LightCycler no se consigue llegar al efecto inhibitorio, pero sí que se consigue en algunas réplicas un atraso claro del inicio de la amplificación acompañado de una caída de la señal de la curva.

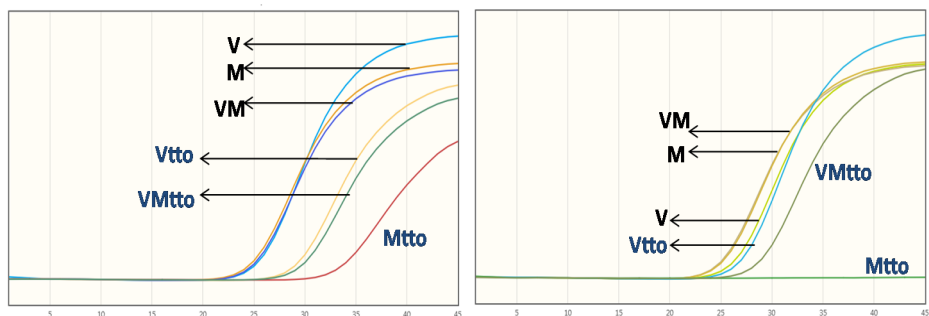


Figura 45: Resultados para la amplificación del protocolo de viabilidad en el sistema BD MAX.

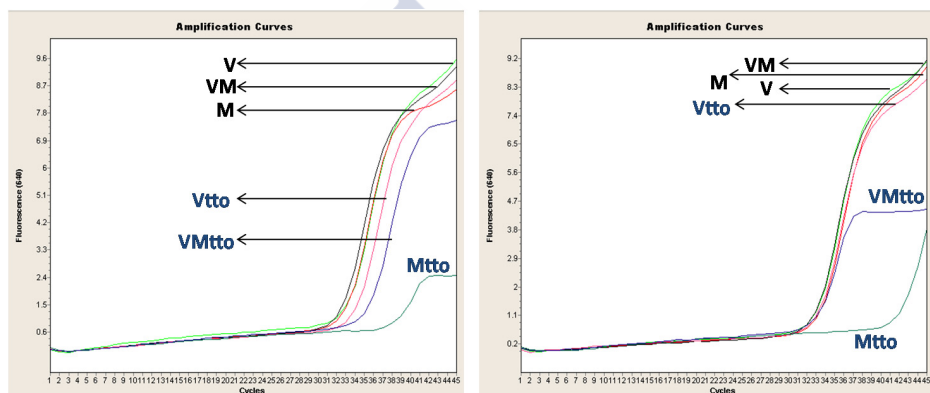


Figura 46: Resultados para la amplificación del protocolo de viabilidad en el sistema LightCycler.

Lo que también vemos en estas pruebas es que, cuando las bacterias vivas son sometidas a nuestro tratamiento, no se ve efecto significativo en la mayoría de los ensayos, lo que es de gran importancia para poder utilizar el tratamiento sin llegar a perder señal cuando se trate una muestra clínica.

Por otro lado, se probó también a realizar la prueba preparando muestras en las que bacterias vivas y muertas se encontrasen mezcladas, como podría darse en una muestra real. Estas muestras se prepararon mezclando, en volúmenes iguales, las soluciones bacterianas que se usaban para preparar las bacterias vivas y muertas por separado. De este modo, aunque estamos metiendo la mitad de concentración de cada grupo de bacterias, nos sirve para ver el efecto claro sobre las bacterias muertas, ya que como se ve en la figura, los controles sin tratar amplifican más o menos en el mismo punto, ya que la cantidad total de bacterias es la misma, independientemente de que estén vivas o muertas. Pero si nos fijamos en la mezcla de bacterias a las que se les aplica el

tratamiento, vemos como claramente hay un atraso en la amplificación, ya que las muertas se verán inhibidas, y como hay la mitad de bacterias vivas respecto al grupo de vivas solas, se ve la amplificación más tarde también respecto a estas. Este efecto lo vemos de forma más clara en los ensayos llevados a cabo en el sistema BD MAX. De este modo vemos como podemos llegar a ser capaces de detectar en una muestra, de forma mayoritaria, solamente a aquellas bacterias que están vivas.

4.4.5 Prueba de viabilidad en sangre usando centrifugaciones

Una vez comprobados los efectos del tratamiento con cisplatino sobre bacterias en solución, se avanzó al siguiente paso, donde las bacterias fueron introducidas en sangre para simular una muestra clínica a la que poder aplicar el tratamiento con el test de viabilidad para la detección específica de bacterias vivas. Cuando se visualizan los resultados en ambos sistemas de detección, se observa que en ningún caso se consigue inhibición o atraso evidente en la amplificación para las bacterias muertas, consiguiendo en muchos casos curvas de amplificación similares, independientemente de que las muestras se hubiesen o no tratado. En la Figura 47 se muestra el resultado de dos experimentos llevados a cabo a partir de sangre con bacterias en el sistema LightCycler, donde se puede ver claramente que no hay diferencias entre las curvas ni de bacterias tratadas ni de las no tratadas, ya que están casi solapadas. Por ese motivo, en la figura no se señala a que muestra corresponde cada curva ya que resulta complicado señalarlas. Sólo en el BD MAX (Figura 48) parece haber un ligero efecto sobre las bacterias muertas tratadas, que las lleva a tener un Ct entorno a 2-3 ciclos más tardíos que aquellas no tratadas, y con una ligera caída en la curva que hace intuir el efecto inhibitorio del cisplatino. De todos modos, este es un efecto muy pequeño que no nos permite la aplicación del protocolo de viabilidad a partir de muestras de sangre.

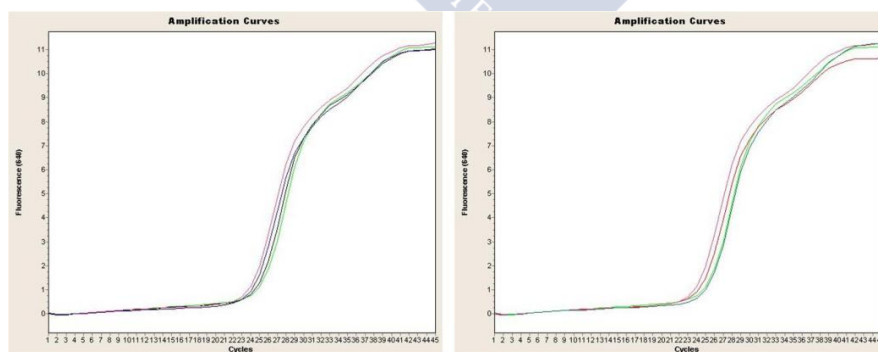


Figura 47: Curvas de amplificación de dos experimentos de viabilidad en el sistema LightCycler a partir de bacterias en sangre recuperadas mediante centrifugaciones.

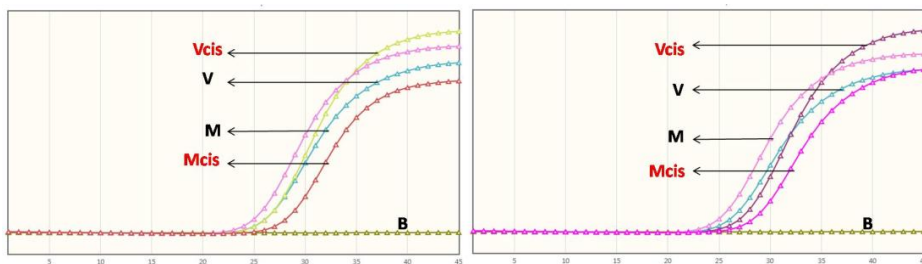


Figura 48: Curvas de amplificación de dos experimentos de viabilidad en el sistema BD MAX a partir de bacterias en sangre recuperadas mediante centrifugaciones.

4.4.6 Prueba de viabilidad con oxaliplatino

Con la esperanza de poder complementar la actividad del cisplatino en nuestro test de viabilidad, o incluso de mejorar la acción o simplificar las condiciones de trabajo, se llevaron a cabo pruebas con el oxaliplatino sobre grupos de bacterias vivas y muertas. Lo que se observa en nuestros resultados es que en la mayoría de las condiciones, incluso sin llegar a una inhibición completa en la detección de las bacterias muertas, es que esta sustancia presenta un mayor efecto toxico y con efecto inhibitorio sobre el grupo de bacterias vivas. De este modo, se convierte en una molécula que no nos permite su uso, ya que tiene efecto sobre toda la población bacteriana interfiriendo en la detección para el diagnóstico. Un ejemplo del efecto de esta nueva sustancia lo vemos en la Figura 49, que muestra los resultados de la amplificación de las muestras en el sistema LightCycler (ROCHE) en un ensayo en el que la concentración de tratamiento con oxaliplatino era de 350 $\mu\text{g/mL}$ durante 45 minutos a temperatura ambiente. Y aunque la concentración de oxaliplatino es aproximadamente la mitad de la establecida para el cisplatino, se ven los claros efectos inhibitorios atrasando las curvas y disminuyendo la intensidad de señal en las curvas de amplificación, tanto en bacterias vivas como en bacterias muertas.

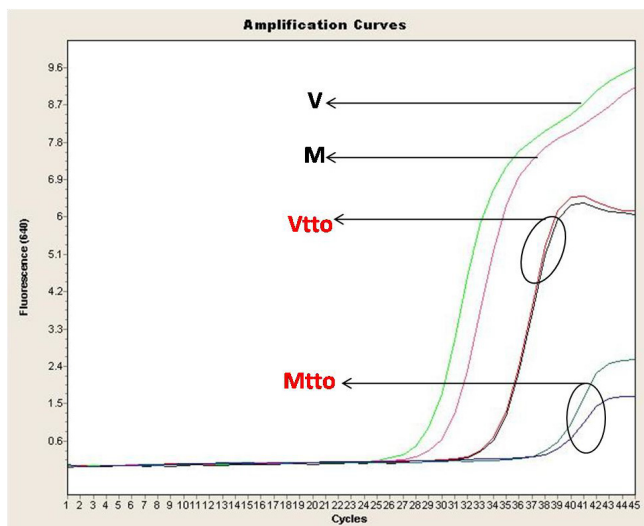


Figura 49: Resultado de amplificación en LightCycler para el ensayo de viabilidad usando oxaliplatino en el tratamiento de las muestras.

4.4.7 Pruebas con otras sustancias con efecto citostático

Para ninguno de los otros citostáticos probados se obtiene resultado de inhibición completa sobre la amplificación de las bacterias muertas. Si que llegamos a conseguir un cierto efecto inhibitorio con algunos de ellos, pero al mismo tiempo también se ve efecto sobre las bacterias vivas (camptotecina, amsacrina, mitoxantrona, elipticina, etoposido). En el resto no conseguimos ningún efecto de inhibición tras hacer los tratamientos (5-fluoracilo, cromomicina). Una muestra de los resultados se puede ver en la Figura 50 y la Figura 51.

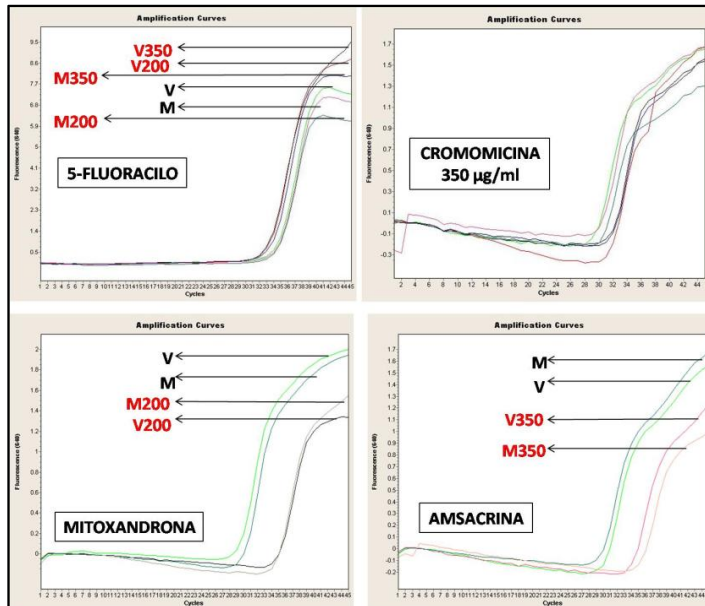


Figura 50: Muestra de los resultados obtenidos con el tratamiento con distinto citostáticos.

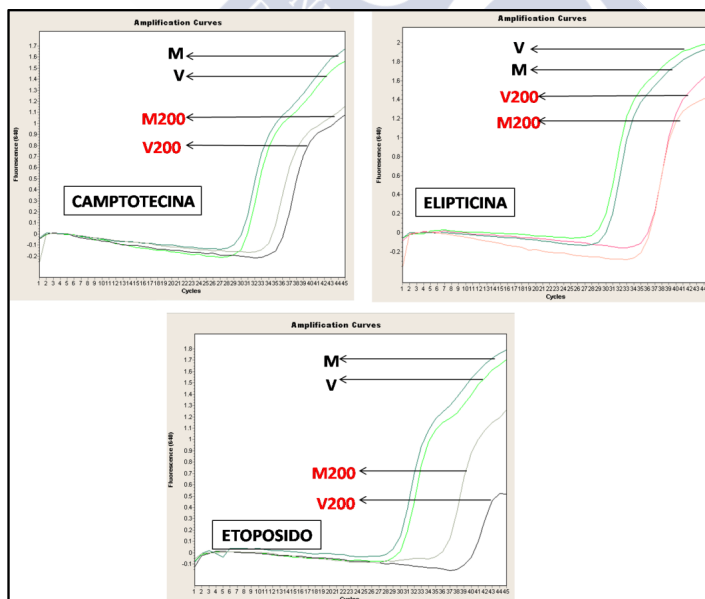


Figura 51: Muestra de los resultados obtenidos tras el tratamiento con el resto de citostáticos.

4.5 NANOPARTÍCULAS Y VIABILIDAD (TEST DE VIABILIDAD)

4.5.1 Prueba de captura de bacterias muertas usando nanopartículas

Para comprobar su capacidad de unión a las bacterias, su recuperación y su crecimiento posterior, se usaron ambos tipos de nanopartículas sobre soluciones bacterianas del modo ya indicado posteriormente. Tanto para las partículas NANO MR como para las ApoH se demuestra su capacidad de captar y retener las bacterias ya que, por un lado, la siembra en placa realizada al final del proceso de recuperación muestra un crecimiento para ambas, y por otro lado, la detección mediante extracción de ácidos nucleicos y la posterior amplificación del modo ya indicado es positiva para ambas partículas.

Por otro lado, cuando se realiza el mismo procedimiento a partir de bacterias muertas por calor, no se consigue detectar crecimiento en placa ni a partir de la solución original ni a partir de las bacterias recuperadas tras la separación con los dos tipos de partículas. Pero sí que se consigue la detección mediante PCR a tiempo real realizada en el sistema BD MAX, en las muestras en las que se usó tanto las partículas NANO MR como en las que se usaron las partículas ApoH.

4.5.2 Prueba de viabilidad en sangre usando nanopartículas

4.5.2.1 Partículas NANO MR

Cuando su usa como muestra sangre a la que le añadimos las bacterias, le realizamos la separación con estas partículas magnéticas, y a continuación el tratamiento con cisplatino, conseguimos unos resultados no del todo similares. Si nos fijamos en la Figura 52, podemos ver un efecto claro de inhibición parcial sobre las bacterias muertas tratadas con un ligero atraso en el Ct, pero con una caída clara en la intensidad de la curva de amplificación. Además, sólo se ve un ligero efecto sobre la mezcla de bacterias vivas y muertas tratadas. Sobre las bacterias vivas tratadas parece no haber efecto, ya que no hay atraso en el inicio de la amplificación. Otro esnayo usando las nanopartículas de NANO MR se ve en los resultados mostrados en la Figura 53. En ella podemos ver como el efecto inhibitorio en las bacterias muertas sigue sin ser completo, e incluso en este caso se pierde parte del efecto sobre la intensidad de señal de la curva pero manteniendo un ligero atraso en el Ct respecto a las muertas no tratadas. También vemos que se mantiene el ligero efecto de atraso en el Ct para la mezcla de bacterias tratadas. Las bacterias vivas tratadas parecen mostrar un leve efecto si se compara con las curvas del experimento mencionado previamente.

Un dato a destacar en el desarrollo de estas pruebas, es la tendencia a cierta formación de agregados por parte de estas nanopartículas desde los inicios de su separación y lavados a partir de la mezcla, aunque se llegan a deshacer por completo por

inversión de los tubos. Tras el tratamiento con cisplatino, tras la primera separación en el imán, estos agregados se mantienen y no permiten la correcta resuspensión de las partículas.

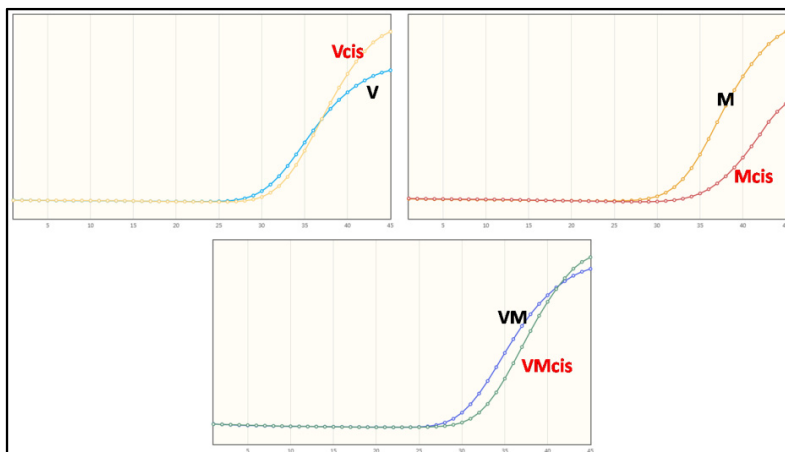


Figura 52: Ejemplo de resultado de amplificación para el protocolo de viabilidad usando las partículas NANO MR.

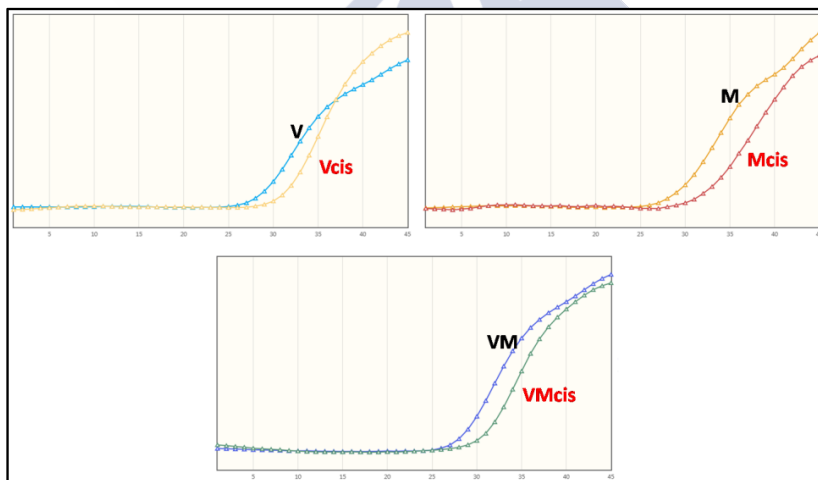


Figura 53: Ejemplo de resultado de amplificación para el protocolo de viabilidad usando las partículas NANO MR.

4.5.2.2 Partículas ApoH

Al realizar el protocolo de viabilidad en sangre usando estas partículas, nos encontramos con unos resultados muy similares a los obtenidos en la etapa previa realizada en solución. Observamos así, de forma mayoritaria, la inhibición completa de la

amplificación en las bacterias muertas tratadas con cisplatino en comparación con las no tratadas como se ve en la Figura 54A y en la Figura 55. Sólo en alguno de los experimentos no fue posible la inhibición de la amplificación, pero se consiguió un claro atraso en el Ct, así como una caída en la intensidad de la señal de la curva de amplificación, como se ve en la Figura 54B. También se ve en los resultados de los experimentos que no parece haber un efecto claramente significativo del tratamiento con cisplatino sobre las bacterias vivas, ya que no se detecta atraso en el Ct ni descenso de la intensidad de señal, salvo en un caso aislado como se ve en la Figura 55. En esta lo que se ve es, básicamente, una pequeña caída en la curva de las bacterias vivas tratadas. Y si tenemos en cuenta a aquellas muestras en las que se mezclan tanto bacterias vivas con bacterias muertas, nos encontramos con unos resultados bastantes constantes, en los que se mantiene lo que parece un ligero efecto inhibitorio sobre la fracción de bacterias muertas de la mezcla tratada con cisplatino que se refleja en un atraso en el Ct que se mantiene en los experimentos, y que se puede ver en la Figura 54 y la Figura 55.

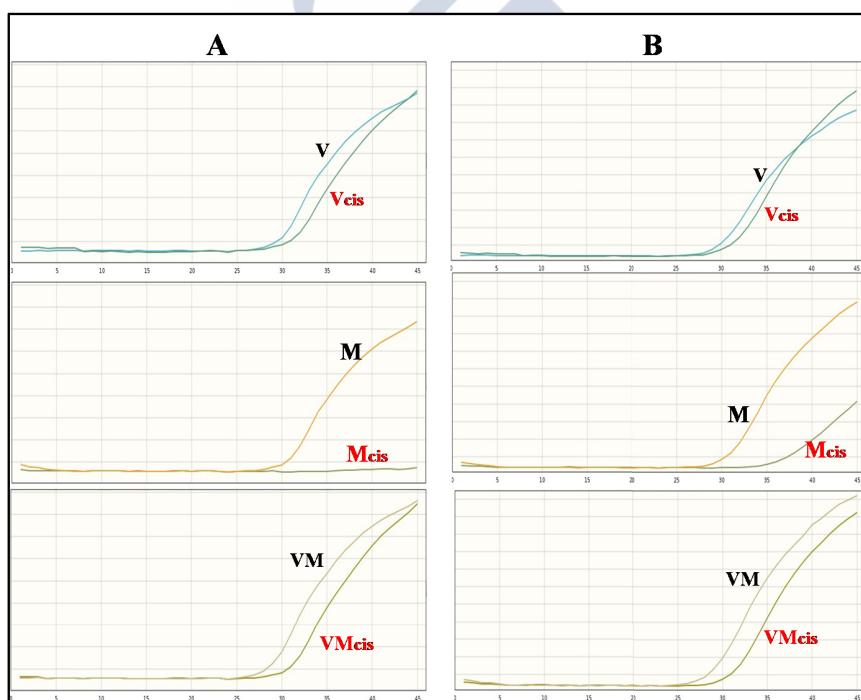


Figura 54: Ejemplo de resultados de dos (A y B) experimentos de viabilidad con las partículas ApoH a partir de sangre en el sistema BD MAX.

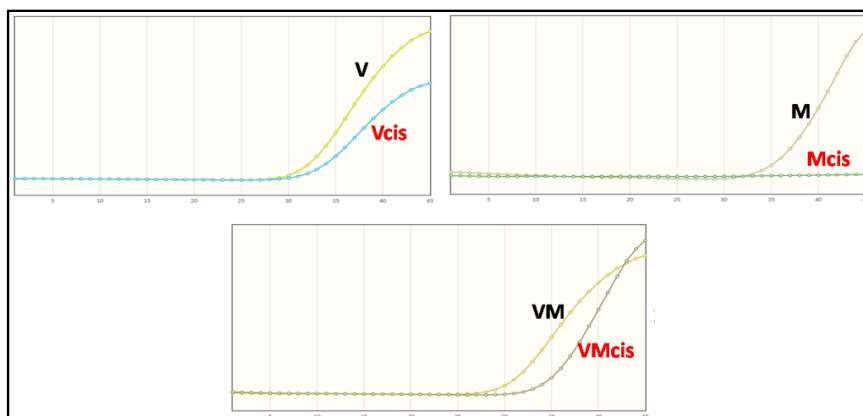


Figura 55: Resultado de otro experimento de viabilidad con las partículas ApoH a partir de sangre en el sistema BD MAX.

4.6 ENSAYO SOBRE BACTERIAS MUERTAS POR TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

Al realizar este nuevo ensayo lo primero que comprobamos es que, tanto para las soluciones originales de bacterias muertas por calor como para las muertas por tratamiento antibiótico, no había crecimiento tras ser cultivadas en placas de agar sangre tras 18-24 horas de incubación. Esto nos asegura que partimos del punto que queríamos, y de que los resultados finales van a ser fiables en base a este punto de partida. Cuando realizamos el protocolo de tratamiento ya descrito y hacemos la detección en el sistema BD MAX, nos encontramos con amplificación en todas las muestras, pero con algunas diferencias entre ellas. En primer lugar, como se ve en la Figura 56, se ve perfectamente la amplificación de las muestras con bacterias vivas aunque nos encontramos con un efecto mayor de lo esperado en aquellas que fueron tratadas con cisplatino. Si nos fijamos en ambos grupos de muertas sin tratamiento, vemos que ambas muestran una amplificación prácticamente igual, y que nos permite ver de forma aún más clara el efecto del tratamiento con cisplatino sobre ambos tipos de bacterias muertas. Como se ve en la figura, tanto en la muestra con bacterias muerta por calor como en las muertas por tratamiento antibiótico, hay un atraso muy significativo en el Ct de ambas muestras así como una caída elevada de las curvas de amplificación, lo que nos confirma el claro efecto inhibitorio del tratamiento, aunque no sea de forma completa. En la Figura 57 se ve más clara la comparación solamente entre los dos grupos de bacterias muertas, donde se ve un claro atraso en el Ct de unos 10 ciclos para ambas, aunque con una caída de la curva más acusada en el grupo de las bacterias muertas por calor.

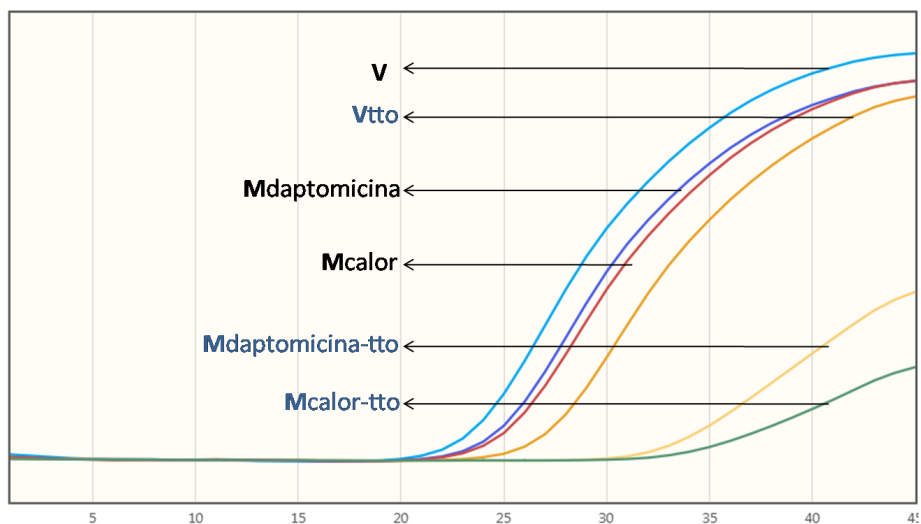


Figura 56: Curvas de amplificación del ensayo de viabilidad sobre bacterias muertas con tratamiento antibiótico y de los controles de bacterias vivas y bacterias muertas por calor.

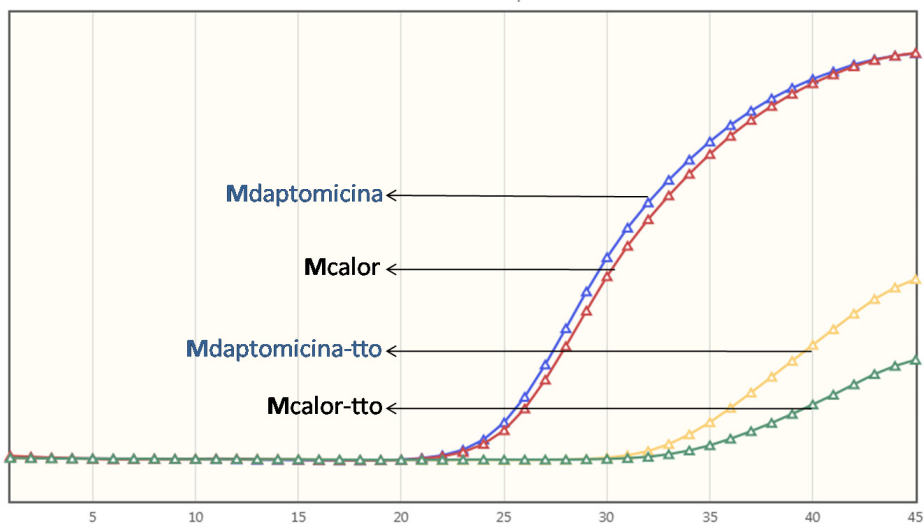


Figura 57: Curvas de amplificación comparando sólo las bacterias muertas por calor con aquellas muertas por tratamiento antibiótico.





5. DISCUSIÓN





5.1 DISEÑO DE NANOPARTÍCULAS PARA LA MEJORA DE LA EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Un aspecto crítico a la hora de realizar pruebas diagnósticas, es el procesamiento previo de la muestra. La manipulación apropiada de la misma, nos va a permitir realizar de forma segura y fiable los análisis necesarios.

El procesamiento preanalítico de la muestra, diferencia el análisis con técnicas moleculares del resto de las tecnologías de trabajo en el laboratorio de Microbiología.

En efecto, a la hora de realizar un diagnóstico usando técnicas de biología molecular y amplificación genética;

(1) es siempre necesario realizar previamente una extracción de ácidos nucleicos que permita separar estos del resto de los elementos de la muestra que potencialmente puedan interferir las determinaciones que vamos a realizar.

(2) El proceso de extracción debería servir además de sistema de concentración de los ácidos nucleicos para mejorar su límite de detección (10,15).

(3) Estas técnicas basadas en la PCR necesitan obtener la máxima pureza posible para poder llevar a cabo la mejor amplificación de la región diana del genoma del microorganismo a detectar.

Para lograr la recuperación de los ácidos nucleicos de una muestra se utilizan actualmente casi de forma generalizada, métodos automatizados basados en el uso de nanopartículas magnéticas, de forma que la superficie de estos soportes sirva como sistema facilitador de los lavados sucesivos que incluye la química de los procesos de extracción.

La unión de las superficies de estas partículas a los ácidos nucleicos se realiza mediante adsorción inespecífica, permitiendo la fácil recuperación y separación del resto de elementos de la muestra, en general, se ha buscado la capacidad superparamagnética en las partículas, para facilitar la suspensión en líquidos al retirarse el campo magnético de la zona próxima a las mismas. La rapidez de esta separación y su automatización, permiten su aplicación a gran escala, logrando el procesamiento de altos números de muestras diversas, minimizando las contaminaciones y el deterioro de los ácidos nucleicos inducido por las nucleasas (15, 59).

En nuestro trabajo, con el objetivo de conseguir recuperar a partir de las muestras la mayor cantidad posible de ácidos nucleicos y así mejorar el diagnóstico, hemos desarrollado diversas nanopartículas magnéticas, probadas en un proceso de extracción automatizado, valorando su posible aplicación/ utilidad en el ámbito clínico.

Estas nanopartículas, fueron diseñadas con pequeños cambios de tamaño entre ellas, con diferencias en su revestimiento y algunas se funcionalizaron en su superficie con

grupos reactivos para la unión a los ácidos nucleicos, esto último, como un paso en el intento de acercarnos a una posible adsorción específica, que pudiese mejorar el proceso de extracción.

Como hemos visto en los resultados presentados, sólo una de nuestras partículas obtuvo valores significativos de captura de ADN.

Se trata de unas nanopartículas de magnetita de pequeño tamaño (10 nm), recubiertas de una pequeña capa de sílice y sin ningún tipo de molécula funcionalizando su superficie. Estas partículas, mostraron mejores resultados (a) que aquellas que no tenían ninguna cubierta, (b) que aquellas que fueron recubiertas con PAA, y (c) que aquellas recubiertas con sílice pero con una capa mayor.

Las partículas que se funcionalizaron con grupos reactivos en la superficie de la cubierta de sílice mostraron, sorprendentemente, unos malos resultados a la hora de capturar y recuperar ADN.

Una posible justificación de este fallo, podría ser en que aquellas partículas con una mayor cubierta de sílice, podrían no ser retenidas tan eficazmente por el imán, por culpa del grosor de la cubierta que “enmascararía” el magnetismo del núcleo metálico de las partículas, provocando el arrastre de las mismas durante las fases de lavado y por tanto perdiendo el ADN que pudiesen tener unido. El disponer de imanes de mayor potencia quizás podría permitirnos ver alguna mejora en la tasa de recuperación de estas partículas.

Como ya se comentó, una de las ventajas de la sílice, es que proporciona a las nanopartículas, una carga negativa, que les va a dar gran estabilidad en suspensión, impidiendo su agregación, y por tanto favoreciendo la unión a su superficie de moléculas de ADN (143, 144). De este modo podría explicarse el mal resultado de las partículas de magnetita desnuda en las que la posible inestabilidad y tendencia a agregarse, podría dificultar su unión al ADN.

La funcionalización de la superficie de las nanopartículas con moléculas portadoras de grupos reactivos, es una estrategia habitual usada a la hora de especializar las funciones de estas, favoreciendo su unión a moléculas biológicas específicas, pudiendo así, por ejemplo, unirse a biomoléculas como proteínas para su separación a partir de una muestra biológica o incluso para su unión específica a tipos celulares concretos, para ayudar en su separación y detección, así como para servir de marcaje a la hora de aplicar técnicas de imagen en diagnóstico (resonancia magnética), etc. (71).

Con esta idea, fue con la que diseñamos nanopartículas que, además de su cubierta de sílice, llevaban unidas en su superficie moléculas portadoras de grupos reactivos con afinidad por biomoléculas, en este caso ADN. La molécula que se usó para funcionalizar las nanopartículas para intentar pasar a una adsorción específica del ADN, fue el aminopropiltrietoxisilano (APTS ó APS), que mediante su hidrólisis y condensación en

la superficie de las nanopartículas nos proporciona grupos amino, que van a poder unirse al ADN. Cuando las dos nanopartículas que fueron funcionalizadas con APS, se probaron en la extracción de ADN, nos encontramos que sus rendimientos no eran lo esperado, ya que obtuvimos valores inferiores al 0,1 % o incluso con niveles de no detección del ADN o no recuperación del mismo (partículas FeO-2206-APS y FeO-2207-APS). Estas partículas, ni siquiera se aproximaron en su capacidad de absorción de ácidos nucleicos a los valores obtenidos para las nanopartículas recubiertas de sílice (FeO-2206).

Para las partículas FeO-2207-APS, podríamos justificar los malos resultados obtenidos, en función del mayor diámetro de las partículas, debido a la cubierta más gruesa de sílice, que podría impedir la adecuada atracción de las mismas cuando se aplica un campo magnético con el imán del sistema automático. Cuando vemos los resultados de las partículas FeO-2206-APS, esta explicación no nos parece suficiente ya que el rango de tamaño de las nanopartículas es prácticamente igual al de las FeO-2206 que mostraron mejores resultados y aunque el hecho de tener grupos amino en su superficie debería favorecer la unión a las moléculas de ADN, los resultados indican que en nuestras partículas esta funcionalización puede no ser del todo adecuada por generar una reducción de la cantidad de moléculas que se van a poder unir a las partículas, por una teórica reducción de superficie total disponible al añadir estos grupos sobre la superficie de sílice de las mismas. También, se podría suponer que las condiciones concretas del proceso de extracción, como podrían ser la composición de los distintos tampones usados para los lavados y la liberación final del ADN de las partículas para su recuperación, no favoreciesen de la misma manera la correcta captura y posterior liberación del ADN, produciéndose la pérdida de este durante los distintos pasos del proceso de extracción.

La necesidad fundamental a la hora de aplicar las técnicas de biología molecular en el diagnóstico, es el poder conseguir una cantidad suficiente de los ácidos nucleicos diana, de la forma más pura posible, que pueda ser detectado posteriormente (46, 48). En estas extracciones de ADN lo que se es capaz de recuperar son los ácidos nucleicos totales y no solamente de los de la diana buscada, así es importante obtener el máximo rendimiento posible del ADN para tener la mayor proporción de nuestra diana o, alternativamente, ser capaces de hacer una separación específica del ADN de interés tras la funcionalización de las partículas con moléculas que presentan oligonucleótidos específicos para un ADN diana.

Nuestro intento inicial de funcionalización de nanopartículas resultó ser poco efectivo.

Al comparar los rendimientos obtenidos con las nanopartículas recubiertas de sílice, con los de un sistema automático de extracción de ácidos nucleicos pudimos valorar la utilidad de nuestras partículas. Lo que vimos; fue que las partículas FeO-2206 tenían unos resultados, que aunque no iguales, se aproximaban a los valores obtenidos por las

partículas del sistema automático, al valorar las cantidades totales de ADN extraído. Esto nos proporciona unas nanopartículas susceptibles de modificaciones o de ajustes en el proceso de extracción, que nos podrían proporcionar una herramienta útil a la hora del procesamiento previo de nuestras muestras biológicas para su posterior análisis molecular.

5.2 DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DEL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A METICILINA

La detección del *S. aureus* resistente a meticilina es importante en el cuidado de los pacientes y en la apropiada utilización de los métodos de control de la infección nosocomial (169, 173). En la actualidad, hay disponibles gran variedad de ensayos fenotípicos y moleculares para la detección de MRSA. Al contrario que los ensayos basados en el cultivo, las pruebas moleculares requieren menos tiempo hasta la obtención del resultado, convirtiéndose en una alternativa muy útil para el manejo del paciente. El uso de estas técnicas moleculares, a día de hoy, no implica el abandono de las técnicas fenotípicas clásicas en el laboratorio, ya que al añadirlas al catálogo de técnicas disponibles para el diagnóstico, podemos disponer de herramientas complementarias y obtener una mayor información, de una forma rápida, para usarla para el beneficio del paciente.

En esta parte de nuestro estudio, podemos ver que incluso las técnicas moleculares no son infalibles, bien por tener un límite de detección alto o por la circulación de cepas que no son susceptibles de amplificación con las sondas seleccionadas, nos podemos encontrar con falsos negativos o discrepantes en algunas de las técnicas. Para evitar encontrarse en esta situación, es recomendable poder usar en el laboratorio técnicas, con fundamentos distintos, que puedan complementarse para poder discriminar entre aquellas muestras realmente negativas o positivas y en caso de duda poder apoyarse en datos firmes a la hora de comunicar un resultado, que en los casos de aplicación de tratamiento antibiótico pueda ser aplicado de forma efectiva, cuando sea necesario. Por eso el uso complementario de las técnicas fenotípicas clásicas (cultivo, antibiograma, pruebas bioquímicas), de la proteómica con el uso de herramientas como la espectrometría de masas (MALDI-TOF) y las técnicas moleculares (PCR, PCR a tiempo real, hibridación) nos van a permitir obtener más información y como vemos en nuestro trabajo, pueden complementarse, resolviendo algunos casos dudosos obtenidos de cualquiera de las técnicas usadas. Además, la combinación de la información obtenida con estas técnicas nos va permitir caracterizar en profundidad, todos aquellos microorganismos de interés, combinando datos fenotípicos y datos genotípicos, permitiendo tiparlos y compararlos entre si de una forma más eficaz.

Algo que también hay que tener en cuenta a la hora de la detección de estos resultados negativos falsos, es la necesidad de una vigilancia y actualización constante de las técnicas de Biología Molecular.

Debido a la creciente variabilidad genética, que se ve afectada entre otros aspectos; por la presión de resistencias en muchos microorganismos y la aparición de nuevos tipos de mutantes dentro de una misma especie, con pequeños cambios que favorecen su expansión y adaptación, convirtiéndose muchas veces en un problema de salud. Algunas veces, estas variantes pueden no ser detectables con las sondas o los algoritmos inicialmente desarrollados para el diagnóstico. De ahí la necesidad de la vigilancia, en busca de nuevas variantes de mutantes, para que puedan ser identificados y caracterizados los cambios genéticos implicados y para que puedan ser incorporados posteriormente a las técnicas moleculares usadas en el diagnóstico.

El hecho de encontrar técnicas moleculares basadas en la PCR con resultados distintos entre si (discrepantes), nos hace subrayar, la ya conocida importancia de la elección de las dianas de amplificación a la hora de diseñar una técnica de detección. El buen conocimiento del genoma del microorganismo en cuestión, así como de los elementos móviles implicados también en algunas resistencias y el poder caracterizar las regiones concretas implicadas en la aparición de las resistencias, es de gran importancia a la hora de la elección de las dianas de amplificación, ya que puede implicar dejar fuera de nuestra capacidad de detección a cepas con pequeñas variaciones en las regiones inicialmente seleccionadas. En nuestro estudio encontramos que la técnica “BD MAX MRSA Assay” nos da 4 resultados falsos positivos, frente a los 14 que nos encontramos con la técnica “LightCycler MRSA Advanced Test”. Este es un resultado claramente positivo a favor del ensayo diseñado para el sistema BD MAX, demostrándonos su utilidad a la hora de poder usarlo como herramienta de cribado en los pacientes con sospecha clínica. Lo que vemos también, es que a pesar de ser ensayos diseñados para la amplificación de los genes implicados en la resistencia a ampicilina, sólo uno de ellos consigue una buena cobertura a la hora de detectar los distintos tipos en los que se pueden agrupar estas variantes resistentes.

El uso paralelo de las técnicas fenotípicas y otras técnicas moleculares, nos llevan a apoyar la correcta asignación de los distintos aislados como verdaderos MRSA, permitiéndonos valorar los resultados obtenidos y demostrando la utilidad del uso combinado de distintas técnicas en el laboratorio.

Para intentar conocer algo más de estos aislados con resultado negativo por alguna de las técnicas se llevaron a cabo análisis de distancias; utilizando técnicas de biología molecular (rep-PCR y PCR convencional), así como de espectrometría de masas (MALDI-TOF) para el análisis proteómico. El estudio de las distancias genéticas obtenido por rep-PCR nos mostró similitudes entre los aislados negativos, pero no nos

permitió encontrar diferencias de agrupación entre aquellas negativas por una técnica o las muestras negativas por las dos técnicas. Cuando la caracterización se llevó a cabo mediante la espectrometría de masas, comparando los espectros proteicos generados mediante un dendrograma, nos encontramos con una separación clara entre los dos grupos de negativos, indicándonos algún tipo de posible diferencia que podría estar influyendo en la capacidad de detección por cada una de las técnicas.

Cuando se intenta un tipado de los aislados basado en la caracterización por PCR de los distintos tipos de la región SCCmec, vemos una variedad de tipos entre los aislados, e incluso en dos de ellos no hemos sido capaces de llegar a esta caracterización. Esto no nos permite asignar un problema en la detección asociado a un tipo concreto, basándonos en la región SCCmec, si no, probablemente se trate de variantes con cambios en regiones más específicas que pueden estar implicados en cualquiera de los distintos tipos.

5.3 USO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LA CAPTURA DE MICROORGANISMOS Y POSTERIOR DETECCIÓN

En el diagnóstico microbiológico nos enfrentamos a diario con gran cantidad de muestras de diversa naturaleza y que va a ser sometidas a procesos convencionales de crecimiento en distintos medios de cultivo, con el fin de aislar e posteriormente identificar y caracterizar con otras técnicas el microorganismo o microorganismos presentes y que puedan ser la causa de la patología en un paciente. Lo malo de este tipo de procesos es que implican gran cantidad de tiempo, necesario para el crecimiento de aquellos microorganismos que se pueden cultivar fácilmente, pero también nos encontramos con microorganismos de difícil crecimiento o incluso que no se pueden cultivar y frente a los que tendremos que usar otras metodologías. Los procesos que implican pasos de cultivo utilizaran tiempos que pueden oscilar entre las 18-24 horas a varios días o incluso semanas, implicando un gran retraso en la asignación nominal concreta o no del microorganismo asociado al cuadro clínico del paciente. Lo ideal, en estos casos, sería poder aislar física y rápidamente, a partir de la muestra, el microorganismo o microorganismos presentes en ella, para poder realizar una detección, por ejemplo, mediante métodos moleculares. Además, esta posibilidad de aislar el microorganismo a partir de la muestra de origen podría ser de gran utilidad para eliminar restos de sustancias inhibitorias u otros elementos a partir de muestras complicadas favoreciendo el proceso de cultivo si es necesario, así como evitando la interferencia de esas sustancias en otras técnicas que se usarían posteriormente y concentrando, en este caso, los microorganismos presentes a partir de los volúmenes diversos de muestra, para ganar así tiempo y eficacia en el diagnóstico.

Del mismo modo que en la extracción de ácidos nucleicos hablábamos de la posibilidad de conseguir una adsorción específica de los ácidos nucleicos en los procesos

de extracción, la modificación de las nanopartículas con moléculas en su superficie como pueden ser anticuerpos u otro tipo de moléculas (ligandos de receptores específicos de membrana) puede convertir a estas partículas en elementos con unión específica a un tipo celular concreto (14, 71). Nuestra intención en este estudio, fue la de probar dos tipos de nanopartículas diseñadas para la unión a microorganismos para bioseparación. Una de las partículas, las ApoH, es un producto comercial de la compañía ApoH technologies (Francia) que usan la unión de esta la proteína de fase aguda ApoH (apolipoproteína H) a la superficie de nanopartículas magnéticas para valerse de su capacidad de unión a proteínas de la superficie de múltiples patógenos (parásitos, virus, bacterias) (267).

La Apolipoproteína H (ApoH), también conocida como β 2-glicoproteína I (β 2-GPI), es una glicoproteína plasmática de 50 kDa. ApoH está presente en el plasma humano en una concentración de entre 150 y 300 mg/ml (272). En sangre, la ApoH circula en conformaciones libres o ligada a lipoproteínas: quilomicrones, lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Además, la ApoH tiene una alta afinidad para las lipoproteínas ricas en triglicéridos. La cantidad de ApoH asociado con las lipoproteínas del plasma en individuos sanos varía según los autores del 4 al 13% hasta alrededor del 40% (273, 274). La ApoH es capaz de activar las lipoproteín- lipasas (Lee et al., 1983). La ApoH fue aislada de la fracción de lipoproteínas plasmáticas y descrito por primera vez en 1961 por HE Schultze (275). En menor medida, también se asocia a fracción de globulinas β 2

La ApoH se expresa en el hígado humano, en las células y tejidos intestinales. En ratas, se han identificado otros sitios de la síntesis en bajas concentraciones como el riñón, intestino delgado, cerebro, cardiomiocitos del corazón y en concentraciones inferiores en el bazo, estómago y próstata. La ApoH es una proteína de fase aguda y cuando se activa, ApoH enlaza, con una relativa alta afinidad, patógenos o sus proteínas, por eso ApoH también se considera como un elemento de la respuesta inmune innata del huésped, particularmente durante la fase aguda. Es difícil de clasificar como proteína de fase aguda positiva o negativa. Esta propiedad se utiliza como un medio para mejorar drásticamente el diagnóstico de agentes patógenos de diferentes orígenes, incluyendo humanos, animales o del medio ambiente y la naturaleza, incluyendo virus envueltos o no envueltos, parásitos y bacterias gram positivas o gram negativas. De hecho, ApoH activada unida a soportes sólidos se ha utilizado para concentrar o para "limpiar" de patógenos inhibidores, algunos métodos de detección.

También en este estudio probamos las nanopartículas de la compañía NANO MR (USA), que en base a la misma estrategia, utilizan la unión de anticuerpos en la superficie de las nanopartículas para unirse a moléculas de superficie de bacterias y hongos. Estas

últimas partículas son un producto de prueba no comercializado usado en una colaboración con la compañía propietaria de las mismas.

Lo que pudimos comprobar al usar estas nanopartículas es que van a ser realmente útiles a la hora de captar y recuperar diferentes microorganismos para posteriormente poder cultivarlos o llevar a cabo extracción de ácidos nucleicos para su detección mediante PCR. Nos encontramos que ambas partículas nos permiten detectar microorganismos a partir de una mezcla, además de demostrar su compatibilidad con diversos sistemas automáticos de extracción al introducirlas como muestra unidas a los microorganismos, facilitando enormemente la capacidad de manipulación y detección.

Estas partículas nos ofrecen múltiples ventajas que las convierten en una alternativa atractiva para ser aplicadas de forma complementaria en protocolos de detección microbiológica tanto dentro como fuera del ámbito clínico.

Lo primero que nos ofrecen estas partículas es la capacidad de capturar los microorganismos presentes en una muestra. Esta captura se lleva a cabo por la unión de forma específica a moléculas unidas en la superficie de las nanopartículas que permite la separación y recuperación en nuestra muestra única y exclusivamente de los microorganismos presentes en ella. En el caso de las nanopartículas NANO MR las moléculas en superficie que van permitir esta recuperación anticuerpos frente a los distintos componentes antigénicos de la superficie de los microorganismos. En el caso de las partículas ApoH, estas llevan unidas a su superficie una proteína plasmática, la Apolipoproteína H (ApoH), que es capaz de unirse a microorganismos como virus (268, 269) y bacterias (270, 271).

En segundo lugar, el uso de estas nanopartículas nos va a permitir realizar un proceso de concentración de nuestra diana, en este caso microorganismos, ya que una vez retiradas de la muestra de origen vamos a poder resuspenderlas en volúmenes menores. Este paso puede ser de gran utilidad cuando se trabaja con títulos bajos de microorganismo que van a hacer que no sea fácil su detección, por ejemplo, en una prueba posterior de PCR ya que la extracción de ácidos nucleicos a partir de un volumen determinado de muestra no va a ser capaz de recuperar los ácidos nucleicos de en proporción suficiente para que puedan ser detectados ya que no va a poder recuperar los de todos los microorganismos realmente presentes en la muestra. De este modo podríamos llegar a incrementar notablemente el límite de detección y la sensibilidad en el diagnóstico.

En tercer lugar, el usar estas nanopartículas nos va a permitir adaptarnos a trabajar con muestras con volúmenes muy variables, desde grandes volúmenes de muestra a bajos volúmenes. Esto es una ventaja ya que en la mayoría de protocolos de extracción los volúmenes de partida son fijos y pueden no coincidir siempre con la disponibilidad de muestra. Además, y como mencionamos en el punto anterior, vamos a poder recuperar y

concentrar microorganismos presentes en baja cantidad a partir de grandes volúmenes de muestra en un solo paso de separación.

En cuarto lugar, la separación específica de los microorganismos con estas nanopartículas nos permite eliminar, en un solo paso, todos los inhibidores presentes en la muestra que podría interferir en los posteriores pasos de detección, tanto impidiendo el crecimiento en cultivo, como inhibiendo la detección mediante PCR. Esto es de gran importancia, ya que nos va a reducir el número de falsos negativos producidos por la propia naturaleza de la muestra, incrementando, así, la especificidad en el diagnóstico. Un ejemplo muy claro se puede ver con las inhibiciones que se producen por un exceso de ADN en los eluidos, recuperados tras una extracción de ácidos nucleicos. En muestras con un exceso de ADN genómico, por ejemplo, muestras de sangre de pacientes con leucocitosis, puede haber una alteración de la amplificación por PCR; inhibiéndola total o parcialmente y dando lugar a un resultado negativo. Por eso, un paso previo de separación con partículas magnéticas en muestras que puedan portar inhibidores o exceso de células, nos va a facilitar la detección en este tipo de muestras.

En nuestros ensayos lo que intentamos, fue probar la capacidad real de unión y captación de microorganismos por parte de las dos nanopartículas mencionadas, para poder así, plantearnos el aplicar el protocolo de separación con nanopartículas magnéticas a distintos grupos de muestras y en distintas situaciones, ayudando a mejorar el proceso de detección.

Cuando en nuestros experimentos probamos las nanopartículas NANO MR para hacer la captación de las 8 bacterias y los 5 hongos, ya vimos que en la posterior detección por PCR a tiempo real todos mostraron un resultado positivo, para el análisis de picos de melting obtenido en el LightCycler. En este punto, destacábamos que para una única bacteria, *E. faecium*, estos valores siempre estaban bajos y próximos a la línea base establecida por el sistema. Cuando las partículas fueron probadas para la captación individual de *S. aureus* resistente a meticilina y su posterior detección en el sistema BD MAX, el resultado también fue positivo. Cuando llevamos a cabo los mismos experimentos usando las nanopartículas ApoH, nos encontramos con el mismo resultado positivo en el BD MAX, pero con algunos resultados negativos para la detección en el LightCycler. En este caso, nos encontramos con resultados negativos en los análisis de picos de melting para *E. coli* y para *A. baumannii*, y nos encontramos con el *E. faecium* con su pico siempre justo en la línea base y por tanto calificado por el sistema también como negativo.

Viendo los resultados en conjunto en el uso de ambas partículas, vemos la capacidad que tienen ambas para poder recuperar, a partir de una mezcla, diversos microorganismos y que posteriormente pueden ser detectados mediante técnicas moleculares comerciales usadas rutinariamente para el diagnóstico clínico. Pero también, nos encontramos con el

problema de entender, que pasa con aquellos microorganismos que parece que se escapan a la captura y/ o a la posterior detección. Lo primero que nos planteamos, en el protocolo de detección, es que pudiésemos estar de algún modo saturando o perjudicando la unión a la superficie de las nanopartículas, por el mero hecho de usar una mezcla de microorganismos. Esto podría indicar dos cosas; por un lado, la posible limitación de las nanopartículas ApoH, para ser usadas en condiciones donde pueda existir mezcla de microorganismos, por no tener una afinidad uniforme para la unión por igual de todos los microorganismos a su superficie, lo que sería una gran limitación. Y en esta misma línea, de la diferente afinidad por algunos microorganismos. Una explicación a lo que podría pasar, sería que las partículas si fuesen capaces de unir a estos microorganismos, pero con una eficiencia mucho menor en presencia de otros microorganismos, llevándonos a una cantidad final de bacteria recuperada menor a la real. Esto nos llevaría a que en el proceso de extracción de ácidos nucleicos se recuperase poca cantidad de ADN, quedando por debajo del límite de detección de la PCR usada para la detección final. Para intentar comprobarlo, se probó la captura y detección de forma individual de estos tres microorganismos con las partículas ApoH, pero los resultados fueron los mismos.

Por lo tanto, lo único que puede explicar en parte este resultado, es la propia recomendación de los fabricantes de las nanopartículas, que indica que, en el caso de usar inóculos de bacterias, no recomiendan el uso de bacterias de colección, como por ejemplo cepas ATCC, si no el uso de cepas de origen clínico. Se basan en que datos propios, indican que las bacterias de colección, pierden su atracción por la apolipoproteína H, debido a la pérdida de factores de virulencia. Aunque esto podría ser cierto, lo que vemos es que en nuestras pruebas, la mayoría de los microorganismos usados, aún siendo cepas de referencia, no se presentaron problemas en ninguno de los ensayos de separación y detección.

Otro punto importante, que destacamos de los resultados de nuestros ensayos, es que estas nanopartículas son compatibles con los sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos probados, lo que permite el uso directo de las propias partículas como sistema de transporte de la muestra tras la recuperación de los microorganismos. Esta compatibilidad, se ve, al ser posible la detección posterior mediante PCR de los distintos microorganismos y nos indica que no existe ningún tipo de interferencia entre partículas con capacidad de absorción específica y las de absorción inespecífica (incluidas en las plataformas) en los procesos de extracción por estas partículas. Esto podría ser esperable ya que estas plataformas usan sistemas de extracción que se basan también en el uso de nanopartículas magnéticas para la recuperación de los ácidos nucleicos de una muestra mediante la adsorción inespecífica a su superficie y posterior liberación, que son también superparamagnéticas. Vemos que el hecho de introducir las nanopartículas con microorganismos unidos a su superficie no va a causar ninguna interferencia durante los procesos de lisis iniciales para la liberación de los ácidos nucleicos debido seguramente a

la gran estabilidad que presentan este tipo de partículas que las hace biocompatibles y que impide su degradación, lo que podría de algún modo desestabilizar las condiciones necesarias de los distintos tampones que se usan para favorecer los pasos de adsorción inicial y liberación final de los ácidos nucleicos y que afectarían así a la posterior detección mediante PCR. Además, se comprueba que el campo magnético utilizado es suficiente en todos los casos.

El poder usar estas nanopartículas en sistemas automáticos ya existentes y la capacidad probada de unión y recuperación de microorganismos para su posterior detección mediante técnicas moleculares, nos permite disponer de unas herramientas muy útiles para la simplificación y mejora de la detección en diagnóstico y en otros ámbitos, aplicando un simple proceso separación que nos va a permitir recuperar, concentrar y liberar de sustancias extrañas nuestra diana, a partir de multitud de muestras y condiciones habitualmente consideradas complejas.

5.4 DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE VIABILIDAD PARA LA DETECCIÓN DIFERENCIAL DE MICROORGANISMOS VIVOS Y MUERTOS

En la sepsis, la confirmación de la infección activa como responsable de la respuesta inflamatoria sistémica, excluyendo otras posibles causas, permite la instauración de una terapia antimicrobiana temprana adecuada que previene la evolución a shock séptico y fallo multiorgánico del SIRS. El diagnóstico rápido (dentro de las primeras 6 horas) y el tratamiento rápido son esenciales para que la terapia pueda ser eficaz. Las guías de práctica clínica en pacientes críticos recomiendan la instauración de terapia empírica en la primera hora tras la sospecha diagnóstica.

Desde el punto de vista de la Microbiología el diagnóstico con los métodos actualmente disponibles nos obligan incluso en las mejores condiciones técnicas a esperar al menos 4 horas para disponer de un resultado útil. Por ello, en la parte final de nuestro trabajo pensamos que sería de utilidad un sistema que mediante métodos moleculares y gracias a su relativa rapidez, pudiésemos valorar el funcionamiento suficiente y adecuado de las terapias empíricas una vez detectada la bacteria problema

El gran avance sufrido en las técnicas de biología molecular nos ha llevado a poder detectar y analizar, mediante la PCR en sus múltiples variantes, cualquier organismo a partir de su material genético. Si esto lo trasladamos al diagnóstico microbiológico lo que nos encontramos es la posibilidad de detectar cualquier microorganismo presente en una muestra biológica así como analizar su genoma en busca de, por ejemplo, mutaciones de resistencia que nos ayuden a la mejor aplicación de los tratamientos. Este abanico de posibilidades que ofrece la PCR se debe a la capacidad de esta técnica para amplificar el material genético diana a partir de cantidades pequeñas en la muestra de origen, sin

importar que las células de las que proviene estén vivas o muertas. Esto, junto con el hecho de la persistencia del ADN en muestras biológicas durante periodos largos de tiempo, hace que la detección de un microorganismo en la muestra de un paciente o en una muestra ambiental o alimentaria nos esté dando una información no del todo acertada. El hecho de poder discriminar entre aquellos microorganismos vivos y muertos presentes en una muestra nos van a permitir concretar cuales están vivos y por tanto pueden ser causantes del cuadro clínico que está sufriendo el paciente, así como poder monitorizar la eficacia del tratamiento ayudando a acortar el mismo así como a orientar en posibles cambios en el caso de que no sea efectivo.

Con la idea de conseguir una amplificación mediante PCR selectiva para detectar aquellos microorganismos vivos nos encontramos desde hace unos años con el uso de unos colorantes vitales con afinidad por el ADN, el EMA y el PMA, que se van a unir de forma irreversible al ADN impidiendo así la posterior amplificación mediante PCR (223, 224). La base del uso de estas sustancias, además de su afinidad por el ADN, es el de la permeabilidad selectiva. Estas son sustancias que no van a ser capaces de atravesar la membrana íntegra de aquellas bacterias vivas o viables, mientras que ante la membrana dañada de una bacteria muerta estas sustancias serán capaces de atravesarla y acabar uniéndose al ADN (241, 242). En teoría esta metodología podría ser aplicada a cualquier microorganismo en cualquier tipo de muestra, aunque lo cierto es que la mayoría de la literatura se refiere a muestras de tipo ambiental o alimentario. Nuestra intención era el intentar trasladare el uso del EMA como tratamiento previo en muestras para uso en diagnóstico clínico. Al aplicar el tratamiento en nuestro protocolo siguiendo las pautas presentes en diversas publicaciones nos encontramos que no conseguimos emular ese efecto inhibitorio de la amplificación. Lo único que conseguimos en nuestros ensayos en el sistema BD MAX es un atraso muy significativo sobre bacterias muertas cuando aumentamos la concentración de EMA con la que tratamos las muestras (máxima concentración probada de 10 ug/ml) pero sin llegar a la inhibición total de la amplificación. Pero además, nos encontramos que este efecto inhibitorio también se manifiesta de forma muy evidente en las bacterias vivas tratadas incluso en concentraciones algo más bajas (5 ug/ml), descartando así la utilidad de esta molécula para nosotros. Cuando las pruebas las llevamos a cabo en el sistema LightCycler sólo somos capaces de conseguir un ligero efecto sobre las bacterias muertas para las concentraciones de 1.25 y 5 ug/ml de EMA, mientras que con la concentración de 10 ug/ml nos encontramos con la inhibición de la amplificación tanto de bacterias muertas como vivas. A pesar de las discrepancias en la literatura sobre si el EMA es el más adecuado por su permeabilidad no tan selectiva al penetrar en células vivas, múltiples publicaciones muestran unos resultados positivos con su uso que nosotros no somos capaces de obtener. Aunque se intentaron algunos cambios en parámetros como el

tiempo de incubación y exposición seguimos sin ser capaces de obtener un resultado satisfactorio.

Como una de las bases de la técnica de viabilidad, radica en tener una molécula con afinidad por el ADN, se nos ocurrió buscar algún tipo de molécula que pudiese actuar del mismo modo que los colorantes vitales ya mencionados. Nuestra elección se centró en un grupo de sustancias de uso terapéutico en quimioterapia y que actúan sobre el ADN induciendo la destrucción de la célula. Estos citostáticos se mostraban como moléculas potencialmente útiles. Tras un buen número de pruebas nos encontramos con dos moléculas, que presentaban una clara actividad sobre el ADN, que se manifestaba al realizar la detección mediante PCR. Estas moléculas eran el cisplatino y el oxaliplatino. La primera en ser probada, fue el cisplatino, usándolo directamente sobre una solución con ADN libre, para comprobar si de verdad presentaba capacidad de unión e inhibición de amplificación del mismo, al someter esa mezcla a amplificación por PCR. El resultado que nos encontramos fue el deseado, donde en todas las muestras en las que se añadió el cisplatino en distintas proporciones, fueron inhibidas para la amplificación, mientras que los dos controles sin cisplatino, mantuvieron una correcta amplificación. Este resultado nos hacía pensar en una unión real con el ADN por parte del cisplatino, aunque aún nos faltaba comprobar si sería capaz de penetrar a través de la membrana bacteriana, y más concretamente, solamente a través de la membrana de las bacterias muertas. Tras comprobar las condiciones para matar las bacterias, sometiéndolas a un choque térmico. Pasamos a probar el cisplatino sobre soluciones de bacterias vivas y de bacterias muertas. Probamos con varias concentraciones y tiempos de tratamiento y nos encontramos que el cisplatino, es capaz de penetrar en las bacterias muertas y unirse al ADN produciendo un efecto inhibitorio que se traduce en el retraso claro de las curvas de amplificación. Con una solución de cisplatino a 1.400 ug/ml, y un tratamiento de las bacterias durante 45 minutos a 37 °C vimos que en los dos sistemas utilizados (MagNA Pure-LightCycler y BD MAX) existía un retraso claro de la amplificación y una caída muy significativa en la intensidad de señal de las curvas de amplificación. Aún así, con el único sistema que conseguimos alcanzar la inhibición completa de la amplificación en bacterias muertas, es con el sistema BD MAX. Ya sea con la inhibición completa o con la caída de la curva formando la meseta que indica un cese en la amplificación, vemos el efecto claro de la acción del cisplatino sobre las bacterias muertas. Sí que es cierto que de forma puntual, y como se mostró en los gráficos de los resultados, se vio un ligero efecto sobre las bacterias vivas que no somos capaces de explicar, pero que con más ensayos, esperamos ser capaces de estabilizar.

En los mismos ensayos, se utilizó un tipo de muestra constituida por una mezcla de bacterias vivas y muertas, para intentar comprobar lo que podría pasar en una situación más similar a lo que nos podríamos encontrar en una muestra clínica real. Cuando vemos los resultados, nos encontramos que los efectos son algo distintos en los dos sistemas.

Por un lado, en el LightCycler no vemos un retraso muy marcado en el inicio de la curva amplificación, si no que en la mayoría de los casos, encontramos una caída de la señal de dicha curva para la mezcla de bacterias vivas y muertas, con la formación de meseta en dicha curva, cesando la amplificación. Aunque no resulta el efecto esperado, sí que es cierto, que resulta un efecto muy significativo, al comparar la amplificación normal de la mezcla. Tanto para la mezcla de bacterias, como para las muertas solas, en el sistema LightCycler, nos encontramos que un posible indicador de presencia de bacterias muertas, no sería únicamente una inhibición completa de la amplificación, si no que también sería indicativo de la presencia de estas, la caída significativa y formación de meseta de la curva al compararla con un control no tratado. Cuando las mezcla de bacterias vivas y muertas se prueba en el sistema BD MAX, nos encontramos siempre con un retraso significativo de la mezcla tratada respecto a la no tratada, lo que con los datos confirmados de efecto claro sobre bacterias vivas individuales, nos hace pensar en que este retraso en el inicio de la amplificación en la mezcla de bacterias vivas y muertas, es debido a la unión del cisplatino al ADN de las bacterias muertas en la mezcla. Y como estaban mezcladas en proporciones iguales, no se produce la inhibición si no un retraso claro del Ct de la muestra, mostrándonos el efecto inhibitorio del cisplatino.

Algo con lo que si nos encontramos, es con un diferente efecto sobre la amplificación al comparar los dos sistemas. El hecho de conseguir una mayor o menor inhibición, va a ser marcada por las diferencias que puedan tener los distintos kits de PCR para la detección del *S. aureus* resistente a metilicina, en base a secuencias de su ADN que no van a ser exactamente iguales. Algo defendido en la literatura, es que el tamaño de la secuencia a amplificar, puede influir y que aquellas secuencias que sean más grandes, presentaran más posibilidades para que se les una la sustancia con afinidad al ADN (252, 253), en nuestro caso el cisplatino y por tanto es más probable que se inhiba más fácilmente su amplificación, que en el caso de fragmentos pequeños de ADN diana, que unirán menos o no conseguirán unir esta molécula, no consiguiendo el efecto posterior de inhibición de la amplificación.

En la misma línea que con el cisplatino y con la idea de complementar o mejorar el tratamiento, se probó una molécula similar que fue el oxaliplatino. A este citostático, al igual que al resto, se le presupone esa capacidad de unión al ADN, que nos podría ser útil inhibiese la amplificación. Desgraciadamente, al probarlo de forma individual nos encontramos con un claro efecto inhibitorio que afecta no sólo a las bacterias muertas, si no también a las bacterias vivas. Esto nos sucede cuando usamos el oxaliplatino en las mismas condiciones, pero a la mitad de concentración de tratamiento de la que usamos el cisplatino, lo determina que esta otra molécula, el oxaliplatino, es una sustancia no útil para nuestro protocolo de viabilidad, en las presentes condiciones. Lo mismo nos encontramos cuando se probaron el resto de citostáticos a la hora del tratamiento de las bacterias.

5.5 APLICACIÓN DEL PROTOCOLO DE VIABILIDAD EN SANGRE

Al encontrar una molécula con la que conseguimos efectos inhibitorios sobre la amplificación de bacterias muertas solas y en mezcla con bacterias vivas, manteniendo sólo efectos en ensayos puntuales sobre bacterias vivas, nos dispusimos a probar nuestro protocolo en un tipo de muestra que ya se asemejase a una muestra clínica. Para ello usamos las bacterias obtenidas del mismo modo, pero introducidas en sangre obtenida en tubos con EDTA de pacientes sanos. En este caso lo que hicimos es aplicar centrifugaciones para intentar eliminar la fracción celular de la sangre y recuperar las bacterias presentes en ella. El motivo principal para no someter a un tratamiento directo la sangre con bacterias es que el cisplatino presenta afinidad por las proteínas en sangre lo que bloquearía buena parte del cisplatino añadido, además de que toda aquella fracción celular presente también actuaría captando nuestro cisplatino y por tanto la dosis sería difícil de calcular y posiblemente el tratamiento no sería efectivo en función de nuestra experiencia previa.

Cuando llevamos a cabo nuestro protocolo y realizamos la amplificación en nuestros dos sistemas de PCR a tiempo real, no fuimos incapaces de reproducir los efectos obtenidos previamente con los tratamientos con cisplatino sobre las bacterias en solución. Por un lado, nos encontramos que en el sistema LightCycler desaparece por completo el efecto de reducción en la intensidad en las curvas de amplificación y los atrasos conseguidos en la amplificación de las bacterias muertas y nos encontramos con unos resultados en los que todas las curvas de amplificación, tanto de bacterias tratadas como en bacterias sin tratar, están cercanas a estar solapadas y con valores de Ct e intensidades prácticamente iguales. Por el otro lado nos encontramos que en el sistema BD MAX el efecto que vemos sobre las bacterias muertas tratadas es solamente de un ligero retraso en el Ct y cierta caída en la intensidad de la curva, que nos parece indicar que el cisplatino si consiguió hacer su efecto, pero en un grado mucho menor al obtenido con las bacterias en solución.

A la luz de estos resultados, parece quedar claro que la recuperación de las bacterias en sangre mediante centrifugación no parece ser del todo efectiva para conseguir eliminar las proteínas libres en sangre, ya que esta sería la única explicación que encontramos a la pérdida de efecto del cisplatino usado en las mismas condiciones.

Debido a su afinidad por las proteínas, el no haber sido capaz de eliminarlas con la centrifugación y lavados posteriores posibilitaría la unión de parte del cisplatino a estas, impidiendo por tanto su entrada en las bacterias muertas para unirse al ADN e inhibir así su posterior amplificación. Como solución a este problema, parecía estar claro que había que encontrar un método más efectivo para conseguir recuperar las bacterias en sangre, dejando atrás toda la fracción celular y cualquier resto de la fracción proteica sería de gran utilidad para poder llevar a cabo nuestro protocolo de viabilidad.

5.6 APLICACIÓN DEL PROTOCOLO DE VIABILIDAD A PARTIR DE SANGRE CON BACTERIAS USANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

El poder eliminar de nuestra muestra todos los elementos capaces de interferir en cualquier proceso posterior de tratamiento y/ o detección supone una mejora de gran importancia en cualquier procedimiento diagnóstico. Para llevar a cabo la recuperación de las bacterias en nuestras muestras y poder aplicar el protocolo de viabilidad, pensamos en la posibilidad de usar nanopartículas magnéticas diseñadas para captar únicamente microorganismos y usar sus propiedades magnéticas para poder recuperarlas con la ayuda de un imán (268, 270). Este uso en nuestro protocolo, es sólo un ejemplo más de la utilidad de las nanopartículas magnéticas en procesos de bioseparación a partir de una muestra compleja, mediante la modificación de superficie añadiendo moléculas de unión específicas como por ejemplo anticuerpos.

Cuando aplicamos a nuestro protocolo la separación de bacterias mediante el uso de dos nanopartículas magnéticas distintas, nos encontramos con resultados algo distintos entre ambas, aunque ambas demuestran la capacidad de recuperación de bacterias a partir de una muestra compleja como es la sangre. Además, estas nanopartículas son compatibles a la hora de introducirlas en los sistemas automáticos de extracción de ácidos nucleicos, al permitir la posterior detección del ADN del microorganismo en cuestión. Estos dos datos, nos permiten considerar el posible uso de estas nanopartículas en el ámbito diagnóstico e intentar mejorar la detección a partir de muestras complicadas o con poca cantidad de microorganismo.

Al comparar el uso de las dos nanopartículas nos encontramos que únicamente; con las ApoH, llegamos a conseguir la inhibición completa de la amplificación de las bacterias muertas tras el tratamiento con el cisplatino, o en el peor de los casos, un retraso muy significativo en el Ct, acompañado de una gran caída de la señal de la curva de amplificación. Además, también nos encontramos con un efecto que se mantiene sobre la mezcla de bacterias tratadas, lo que nos indica la potencialidad de su uso a partir de mezclas bacterianas, con la intención de detectar solamente aquellas que estén vivas. Como único punto negativo, nos encontramos con un ligero efecto, en alguna réplica, sobre las bacterias vivas tratadas, pero, que en base a los resultados globales, no sería del todo significativo y podría ser estabilizado realizando pruebas con nuevos ajustes. Cuando nos fijamos en las partículas de NANO MR, comprobamos que los efectos buscados no son tan marcados como los mencionados en las otras partículas, a pesar de su buena capacidad de recuperación y compatibilidad con los sistemas de extracción y posterior amplificación. Debido a la naturaleza reservada de ambas partículas nos encontramos con datos referentes a ellas que desconocemos, como pueden ser la concentración, densidad, tamaño y composición de las mismas y que podrían ser de interés a la hora de ajustar el protocolo. En referencia a esto, y teniendo en cuenta el

efecto de agregación mencionado en las partículas NANO MR, este efecto podría estar influyendo en una atenuación de los resultados si la formación de estos agregados no permite al cisplatino acceder de forma normal a todas las bacterias de la muestra y por tanto se vería reflejado en un descenso del efecto inhibitorio y las diferencias de resultado entre ambas nanopartículas. Una forma de intentar eliminar estos agregados, para la adecuada dispersión de las nanopartículas, sería mediante sonicación. Aunque no se probó en este protocolo, ciclos cortos y de baja intensidad con un sonicador, favorecen la buena dispersión de las nanopartículas en el medio, lo que podría ayudar a poder aplicar el tratamiento con cisplatino de forma homogénea sobre todas las bacterias. En este punto también habría que tener en cuenta la posibilidad de que un exceso de sonicación podría dañar o romper las bacterias, pudiendo de este modo entrar cisplatino en aquellas que antes no lo haría o perdiendo masa global de bacterias si estas llegasen a romperse. De todos modos, en general lo que nos encontramos es que a partir de una muestra de sangre a la que le añadimos bacterias, somos capaces de llegar a inhibir la amplificación de aquellas bacterias que están muertas, lo que implica una mejora potencial a la hora del diagnóstico y el seguimiento.

5.7 PROTOCOLO DE VIABILIDAD SOBRE BACTERIAS MUERTAS POR TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

Uno de los puntos de importancia a la hora del diagnóstico microbiológico es la correcta identificación y caracterización de agente infeccioso, para poder aplicar el tratamiento adecuado lo antes posible. Por eso, identificar en una muestra solamente aquellos microorganismos que estén vivos y que por tanto puedan ser causantes de un cuadro clínico es muy importante, ya que supuestamente el ADN de bacterias muertas libre o en la propia bacteria más o menos fragmentada, podría perdurar en una muestra durante un periodo largo de tiempo y por tanto ser detectada por técnicas moleculares, esto se ha llamado DNAhemia. Además, a la hora de monitorizar la eficacia de un tratamiento antibiótico de forma rápida, sería de gran utilidad el poder distinguir mediante PCR la presencia o no de bacterias muertas, llevando a acortar o modificar los tratamientos antibióticos más rápida y eficazmente.

Con base de nuestro protocolo de viabilidad, ya comprobamos que es posible llegar a inhibir la amplificación de bacterias muertas en solución y también a partir de sangre. Las bacterias muertas con las que trabajamos en nuestros protocolos las conseguimos someténdolas a un choque térmico. Para comparar la utilidad en una muestra clínica real, nuestra idea era la de conseguir bacterias muertas, pero por efecto de un tratamiento antibiótico, simulando así lo que podríamos obtener en una muestra clínica real. Cuando introdujimos bacterias en una solución con antibiótico (daptomicina) y comparamos el efecto del tratamiento con cisplatino con nuestro protocolo con la misma solución de

bacterias muertas por calor, nos encontramos que aunque no llegamos a una inhibición completa, en ambos tipos de bacterias muertas conseguimos un atraso muy significativo en el inicio de la amplificación, acompañado además de una caída elevada en la señal de la curva de amplificación. Aunque inicialmente esta caída es ligeramente mayor en las bacterias muertas por calor, lo que vemos es que nos encontramos con un protocolo de tratamiento previo a la detección por PCR, potencialmente capaz de inhibir la detección de bacterias muertas por tratamiento antibiótico. Aunque estas pruebas con muerte por tratamiento antibiótico son solamente preliminares y necesitan más réplicas parecen indicar la aplicación de nuestro protocolo de viabilidad sería susceptible de probarse en muestras clínicas seleccionadas.

Además de poder estudiar el efecto de la terapia empírica y eventualmente corregirlo.

Una posible utilidad del sistema desarrollado podría ser la solución del problema de la hipotética existencia y papel de la DNAhemia, se denomina así la presencia de ADN de origen bacteriano o fúngico libre en sangre, su existencia se estableció cuando las técnicas de detección de ADN demostraron que frecuentemente se observaban resultados positivos en muestras que luego resultaban negativas con técnicas convencionales, siempre ha existido la duda de si es posible que un foco infeccioso libere DNA bacteriano a la sangre y que el resultado obtenido no representase en realidad una infección sistémica y solo fuese la presencia de los restos de ADN no desnaturalizado por las proteasas. El uso de la determinación de viabilidad permitiría responder a la cuestión de si la detección de ADN y la imposibilidad de recuperación de la bacteria o el hongo con las técnicas convencionales, podría corresponder a una bacteria viva o muerta y si la ADNhemia supone la presencia de una bacteria viable pero que no podemos recuperar o es la presencia de ADN de origen bacteriano circulante en sangre pero con origen en un foco externo a ese compartimento.





6. CONCLUSIONES





1. De todas las nanopartículas probadas en la extracción de ácidos nucleicos, aquellas nanopartículas de magnetita recubiertas de sílice y de menor tamaño (FeO-2206) fueron las únicas que mostraron una capacidad significativa para la captación y recuperación de ADN mediante un proceso de extracción automatizado.
2. Las partículas FeO-2206 se muestran como candidatas para su valoración en la extracción a partir de muestras clínicas ya que, cuando se comparan los rendimientos obtenidos por estas en la extracción de ADN con los obtenidos por el sistema con las partículas originales, observamos que nuestras partículas se mueven en valores próximos.
3. La posible mejora en el diseño de las nanopartículas o la modificación de parámetros en el proceso de extracción como pueden ser los tiempos, la composición de los tampones y la potencia del propio imán podrían ser factores que ayudasen a mejorar los resultados obtenidos en la extracción de ácidos nucleicos con estas nanopartículas.
4. El uso combinado de las técnicas moleculares y la espectrometría de masas para complementar los métodos fenotípicos son herramientas que nos ofrecen resultados alternativos de forma rápida que se pueden aportar más información y ayudar a resolver aquellos casos discrepantes que puedan aparecer, mejorando así la capacidad de respuesta en el laboratorio.
5. La información obtenida combinando todas estas técnicas puede ser de gran ayuda a la hora descubrir y caracterizar nuevas variantes resistentes a antibióticos permitiendo así la actualización de las técnicas diagnósticas.
6. El sistema BD MAX se muestra como un sistema más robusto en sus resultados ya que detectó un mayor número de aislado positivos. Además, al ser un sistema totalmente automatizado permite minimizar los errores debidos a la manipulación, así como la obtención rápida de gran cantidad de resultados.
7. El uso de las nanopartículas magnéticas ApoH y NANO MR nos permite la recuperación y posterior detección mediante PCR a tiempo real de microorganismos a partir de una mezcla mostrándonos así su compatibilidad con los sistemas actuales de extracción usados en el diagnóstico clínico.
8. Esta capacidad de unión específica a microorganismos nos da la posibilidad de su uso a partir de muestras clínicas complejas con el objetivo de eliminar sustancias que afecten al proceso de extracción o la posterior detección. Además, nos permitiría concentrar aquellos microorganismos presentes en bajas cantidades a partir de grandes volúmenes de muestra pudiendo así mejorar la sensibilidad en la detección.
9. El tratamiento de soluciones bacterianas con EMA para su unión al ADN de bacterias muertas y la posterior inhibición de la amplificación por PCR a tiempo real no es posible en las condiciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio y por lo tanto la

detección de la viabilidad no puede ser usada en muestras clínicas usando esta sustancia.

10. Tras los ensayos con múltiples sustancias encontramos que el cisplatino es una molécula útil a la hora de inhibir la amplificación de ADN libre y que consigue la inhibición o la reducción elevada de la misma cuando se tratan con él bacterias muertas. De este modo desarrollamos nuestro protocolo de viabilidad basado en el uso de cisplatino como agente de unión al ADN para la inhibición de su amplificación.
11. La aplicación del nuestro protocolo convencional de viabilidad usando cisplatino no es de utilidad cuando la muestra de partida es sangre que contiene bacterias posiblemente debido al arrastre de proteínas que se unen y bloquean parte del cisplatino usado en el tratamiento.
12. El uso de nanopartículas magnéticas de unión específica a microorganismos para su recuperación a partir de muestras de sangre con bacterias como paso previo al tratamiento con cisplatino nos permite conseguir la inhibición de la amplificación de las bacterias muertas cuando usamos las nanopartículas ApoH.
13. Con nuestro protocolo de tratamiento de cisplatino conseguimos también un efecto inhibitorio a partir de muestras formadas por mezcla de bacterias vivas y muertas que se refleja en un atraso estable de las curvas de amplificación que nos indica la amplificación selectiva en base a la viabilidad.
14. Con las nanopartículas NANO MR a partir de muestras de sangre sólo conseguimos efectos inhibitorios que se reflejan en atraso de las curvas de amplificación y en la caída de la intensidad de la señal en bacterias muertas. Como la agregación sufrida por estas partículas durante el proceso de separación podría ser la causante de estos efectos incompletos del tratamiento con cisplatino, el incluir pasos breves de sonicación a nuestro protocolo podría ayudar a la mejor dispersión de las partículas con bacterias para permitir la correcta actuación del cisplatino sobre todas las bacterias presentes.
15. El efecto del tratamiento con cisplatino con nuestro protocolo de viabilidad sobre bacterias muertas tras ser sometidas a un tratamiento antibiótico muestra efectos similares al realizarlo en paralelo con bacterias muertas por calor. Esto nos permite pensar en la utilidad de nuestro protocolo a partir de muestras clínicas reales para apoyar tanto al diagnóstico inicial como al seguimiento posterior tras la implantación de un tratamiento antibiótico.
16. El uso de nuevos productos nanotecnológicos aplicados al diagnóstico clínico en combinación con las técnicas de biología molecular y un protocolo específico de tratamiento de las muestras nos puede permitir mejorar la sensibilidad diagnóstica para la detección de agentes infecciosos además de ofrecer una herramienta útil en la monitorización de ciertos pacientes sometidos a un tratamiento antibiótico. Esto nos

permite una mejor respuesta diagnóstica y mejor aplicación de los tratamientos antibióticos usándolos sólo ante la evidencia de la presencia de un microorganismos vivos así como la retirada del mismo si no se detecta a este, permitiendo beneficios para el paciente y la reducción del gasto en tratamientos.





7. BIBLIOGRAFÍA





1. Sanvicens N, Marco M.P. Multifunctional nanoparticles: properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.* 2008; 26: 425-433.
2. Navalakhe RM, Nandedkar TD. Application of nanotechnology in biomedicine. *Indian J Exp Biol.* 2007; 45: 160-165.
3. Guía específica de trabajo sobre “Nanotecnología para llevar puesta”. Investiga I +D + i 2014/ 2015. <http://www.programainvestiga.org>.
4. Wong IY, Bhatia SN, Toner M. Nanotechnology: emerging tools for biology and medicine. *Genes & Development.* 2013; 27: 2397–2408.
5. Lynch I, Dawson K.A, Linse S. Detecting cryptic epitopes created by nanoparticles. *Science's STKE.* 2006; 327:14.
6. Silva, GA. Introduction to nanotechnology and its application to medicine. *Surg Neurol.* 2004; 61: 216-220.
7. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 83: 761–769.
8. Llinas MC, Sanchez-Garcia D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. *AFINIDAD LXXI*, 565, Enero - Marzo 2014.
9. Knepp JH, Geahr MA, Forman MS, Valsamakis A. Comparison of Automated and Manual Nucleic Acid Extraction Methods for Detection of Enterovirus RNA. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3532–3536.
10. Diazaraque R, Pacheco R, Roiz JC. Reacción en cadena de la polimerasa. Fundamentos y aplicación en Medicina Interna. *Rev Clin Esp.* 2002; 202: 272-274.
11. Ramos M, Castillo C. Aplicaciones biomédicas de las nanopartículas magnéticas. *Ide@s CONCYTEG.* 2011; 6: 629-646.
12. Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science.* 2003; 301: 1884-1886.
13. Georganopoulou DG, Chang L, Nam JM, Thaxton CS, Mufson EJ, Klein WL, Mirkin CA. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 2273-2276.
14. Bromberg L, Chang EP, Alvarez-Lorenzo C, Magariños B, Concheiro A, TA Hatton. Binding of Functionalized Paramagnetic Nanoparticles to Bacterial Lipopolysaccharides and DNA. *Langmuir.* 2010; 26: 8829–8835.
15. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biot.* 2006; 73:495–504.
16. Tian H, Huhmer AFR, Landers JP. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Anal Biochem.* 2000; 283: 175–191.
17. Breadmore MC, Wolfe KA, Arcibal IG, Leung WK, Dickson D, Giordano BC, Power ME, Ferrance JP, Feldman SH, Norris PM, Landers JP. Microchip-based purification of DNA from biological samples. *Anal Chem.* 2003; 75: 1880–1886.

18. Ferreira GNM, Cabral JMS, Prazeres DMF. Studies on the batch adsorption of plasmid DNA onto anion-exchange chromatographic supports. *Biotechnol Prog.* 2000; 16: 416–424.
19. Endres HN, Johnson JA, Ross CA, Welp JK, Etzel MR. Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechnol Appl Biochem.* 2003; 37: 259–266.
20. Teeters MA, Conrardy SE, Thomas BL, Root TW, Lightfoot EN. Adsorptive membrane chromatography for purification of plasmid DNA. *J Chromatogr A.* 2003; 989: 165–173.
21. Chiang CL, Sung CS, Wu TF, Chen CY, Hsu CY. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *J Chromatogr B.* 2005; 822: 54–60.
22. Kelland DR. Magnetic separation of nanoparticles. *IEEE T Magn.* 1998; 34: 2123–2125.
23. Kuznetsov O, Brusentsov N, Kuznetsov A, Osipov N, Bayburtskiy F. Correlation of the coagulation rates and toxicity of biocompatible ferromagnetic microparticles. *J Magn Magn Mater.* 1999; 194: 83–89.
24. Mikhaylova M, Kim DK, Bobrysheva N, Osmolowsky M, Semenov V, Tsakalakos T, Muhammed M. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification. *Langmuir.* 2004; 20: 2472–2477.
25. Taylor JJ, Hurst CD, Davies MJ, Sachsinger N, Bruce IJ. A pplication of magnetite and silica–magnetite composites to the isolation of genomic DNA. *J Chromatogr A.* 2000; 890: 159–166.
26. Bucak S, Jones DA, Laibinis PE, Hatton T. Protein separations using colloidal magnetic nanoparticles. *Biotechnol Prog.* 2003; 19: 477–84.
27. Peng ZG, Hidajat K, Uddin MS. Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *J Coll Interf Sci.* 2004; 271: 277–283.
28. Xie X, Zhang X, Zhang H, Chen D, Fei W. Preparation and application of surface-coated superparamagnetic nanobeads in the isolation of genomic DNA. *J Magn Magn Mater.* 2004; 277: 16–23.
29. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7: 1513–1523.
30. Chiang CL, Sung CS, Wu TF, Chen CY, Hsu CY. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *J Chromatogr B.* 2005; 822: 54–60.
31. Saiyed ZM, Bochiwal C, Gorasia H, Telang SD, Ramchand CN. Application of magnetic particles (Fe₃O₄) for isolation of genomic DNA from mammalian cells. *Anal Biochem.* 2006; 356: 306–308.
32. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen CM, van der Noorda J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990; 28: 495–503.

33. Tian H, Huhmer AF, Landers JP. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format. *Anal Biochem.* 2000; 283: 175–191.
34. Ferreira GNM, Cabral JMS, Prazeres DMF. Studies on the batch adsorption of plasmid DNA onto anion-exchange chromatographic supports. *Biotechnol Prog.* 2000; 16: 416–424
35. Thwaites E, Burton SC, Lyddiatt A. Impact of the physical and topographical characteristics of adsorbent solid-phases upon the Xuidised bed recovery of plasmid DNA from *Escherichia coli* lysates. *J Chromatogr A.* 2002; 943: 77–90.
36. Endres HN, Johnson JAC, Ross CA, Welp JK. Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA. *Biotechnol Appl Biochem.* 2003; 37: 259–266.
37. Teeters MA, Conrardy SE, Thomas BL, Root TW, Lightfoot EN. Adsorptive membrane chromatography for puriWcation of plasmid DNA. *J Chromatogr A.* 2003; 989: 165–173.
38. Rudi K, Kroken M, Dahlberg OJ, Deggerdal A, Jakobsen KS, Larsen F. Rapid universal method to isolate PCR-ready DNA using magnetic beads. *BioTechniques.* 1997; 22: 506–511.
39. Larsen F. Rapid isolation of PCR-ready DNA from blood, bone marrow, and cultured cells, based on paramagnetic beads. *BioTechniques.* 1997; 22: 554–557.
40. Levison PR, Badger SE, Dennis J, Hathi P, Davies MJ, Bruce IJ, Schimkat D. Recent developments of magnetic beads for use in nucleic acid purification. *J Chromatogr A.* 1998; 816: 107–111.
41. Prodelalova J, Rittich B, Spanova A, Petrova K, Benes MJ. Isolationof genomic DNA using magnetic cobalt ferrite and silica particles. *J Chromatogr A.* 2004; 1056: 43–48.
42. Hawkins TL, O'Connor-Morin T, Roy A, Santillan C. DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4543–4544.
43. Yoza B, Matsumoto M, Matsunaga T. DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *J Biotechnol.* 2002; 94: 217–224.
44. Tan W, Wang K, He X, Zhao XJ, Drake T, Wang L, Bagwe RP. Bionanotechnology based on silica nanoparticles. *Med Res Rev.* 2004; 24: 621–638.
45. Bruce IJ, Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxy-silanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir.* 2005; 21: 7029–7035.
46. Chiang CL, Sung CS, Wu TF, Chen CY, Hsu CY. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells. *J Chromatogr B.* 2005; 822: 54–60.
47. Veyret R, Delair T, Pichot C, Elaissari A. Amino-containing magnetic nanoemulsions: elaboration and nucleic acid extraction. *J Magn Magn Mater.* 2005; 295: 155–163.
48. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martinez-Lamas L, Rodriguez-Calviño J, Aguilera A, Santos A, Gomez-Tato A, Alvarez-Escudero J. Automated Extraction

- Improves Multiplex Molecular Detection of Infection in Septic Patients. PLoS ONE. 2010; 5: e13387.
49. Fiebelkorn, K. R., B. G. Lee, C. E. Hill, A. M. Caliendo, and F. S. Nolte. Clinical evaluation of an automated nucleic acid isolation system. Clin. Chem. 2002; 48: 1613–1615.
 50. Grant PR, Sims CM, Krieg-Schneider F, Love EM, Eglin R, Tedder RS. Automated screening of blood donations for hepatitis C virus RNA using the Qiagen BioRobot 9604 and the Roche COBAS HCV Amplicor assay. Vox Sang. 2002; 82: 169–176.
 51. Grisold AJ, Leitner E, Muhlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2392–2397.
 52. Kessler HH, Clarici AM, Stelzl E, Muhlbauer G, Daghofer E, Santner BI, Marth E, Stauber RE. Fully automated detection of hepatitis C virus RNA in serum and whole-blood samples. Clin Diagn Lab Immunol. 2002; 9: 1385–1388.
 53. Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H. Automated extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. J Clin Microbiol. 2002; 40: 2240–2243.
 54. Mitsunaga S, Fujimura K, Matsumoto C, Shiozawa R, Hirakawa S, Nakajima K, Tadokoro K, Juji T. High-throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its application to analysis of posttransfusion hepatitis. Transfusion. 2002; 42: 100–106.
 55. Rabenau HF, Clarici AM, Muhlbauer G, Berger A, Vince A, Muller S, Daghofer E, Santner BI, Marth E, Kessler HH. Rapid detection of enterovirus infection by automated RNA extraction and realtime fluorescence PCR. J Clin Virol. 2002; 25: 155–164.
 56. Raggam RB, Leitner E, Muhlbauer G, Berg J, Stocher M, Grisold AJ, Marth E, Kessler HH. Qualitative detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavages and induced sputa by automated DNA extraction and real-time polymerase chain reaction. Med Microbiol Immunol. 2002; 191: 119–125.
 57. Tedder RS, Ayliffe U, Preiser W, Brink NS, Grant PR, Peggs KS, Mackinnon S, Kreig-Schneider F, Kirk S, Garson JA. Development and evaluation of an internally controlled semiautomated PCR assay for quantification of cell-free cytomegalovirus. J Med Virol. 2002; 66: 518–523.
 58. Wolk DM, Schneider SK, Wengenack NL, Sloan LM, Rosenblatt JE. Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3922–3928.
 59. Fang X, Willis RC, Burrell A, Evans K, Hoang Q, Xu W, Bounpheng M. Automation of Nucleic Acid Isolation on KingFisher Magnetic Particle Processors. JALA. 2007; 12: 195–201.
 60. Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 2005; 26: 3995–4021.

61. Jain TK, Morales MA, Sahoo SK, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Mol Pharm.* 2005; 2: 194-205.
62. Chourpa I, Douziech-Eyrolles L, Ngaboni-Okassa L, Fouquenet JF, Cohen-Jonathan S, Souce M, Marchais H, Dubois P. Molecular composition of iron oxide nanoparticles, precursors for magnetic drug targeting, as characterized by confocal Raman microspectroscopy. *Analyst.* 2005; 130: 1395-1403.
63. Bulte JW. Intracellular endosomal magnetic labeling of cells. *Methods Mol Med.* 2006; 124: 419-439.
64. Modo M, Hoehn M, Bulté JW. Cellular MR imaging. *Mol Imag.* 2005; 4: 143-164.
65. Burtea C, Laurent S, Roch A, Vander Elst L, Muller RNJ. C-MALISA (cellular magnetic-linked immunosorbent assay), a new application of cellular ELISA for MRI. *Inorg Biochem.* 2005; 99: 1135-1144.
66. Boutry S, Laurent S, Vander Elst L, Muller RN. Specific E-selecting targeting with a superparamagnetic MRI contrast agent. *Contrast Med Mol Imaging.* 2006; 1: 15-22.
67. Babes L, Denizot B, Tanguy G, Le Jeune JJ, Jallet P. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents: A parametric study. *J Coll Interf Sci.* 1999; 212: 474-482.
68. Sonvico F, Dubernet C, Colombo P, Couvreur P. Metallic colloid nanotechnology, applications in diagnosis and therapeutic. *Curr Pharm Des.* 2005; 11: 2091-2105.
69. Corot C, Robert P, Idee JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Delivery Rev.* 2006; 58: 1471-1504.
70. Chastellain M, Petri A, Gupta A, Rao KV, Hofmann H. Superparamagnetic Silica-Iron Oxide Nanocomposites for Application in Hyperthermia. *Adv Eng Mat.* 2004; 6: 235-241.
71. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic A, Vander Elst L, Muller RN. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008; 108: 2064-2110.
72. Sjogren CE, Johansson C, Naevestad A, Sontum PC, Briley-Saebo K, Fahlvik AK. Crystal size and properties of superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles. *Magn Reson Imaging.* 1997; 15: 55-67.
73. Nunes AC, Yu ZC. Fractionation of a water-based ferrofluid. *J Magn Magn Mater.* 1987; 65: 265-268.
74. Martinez-Mera I, Espinosa ME, Perez-Hernandez R, Arenas-Alatorre J. Synthesis of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles without surfactants at room temperature. *Mater Lett.* 2007; 61: 4447-4451.
75. Morrisson SA, Cahill CL, Carpenter E, Calvin S, Harris VG. Atomic Engineering of Mixed Ferrite and Core-Shell Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2005; 5: 1323-1344.
76. Sun YK, Ma M, Zhang Y, Gu N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. *Colloids Surf A.* 2004; 245: 15-19.

77. Qiu J, Yang R, Li M, Jiang N. Preparation and characterization of porous ultrafine Fe₂O₃ particles. *Mater Res Bull.* 2005; 40: 1968-1975.
78. Lee SJ, Jeong JR, Shin SC, Kim JC, Kim JD. Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique. *J Magn Magn Mater.* 2004; 282: 147-150.
79. Jolivet JP, Chaneac C, Tronc E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. *Chem Com.* 2004; 5: 481-487.
80. Cornell RM, Schwertmann U. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. *Clay Minerals.* 1996; 34: 209-211.
81. Boistelle, R.; Astier, J. P. J. Crystallization mechanisms in solution. *J Crystal Growth.* 1998; 90: 14-30.
82. Sugimoto T. Formation of monodispersed nano- and micro-particles controlled in size, shape, and internal structure. *Chem Eng Tech.* 2003; 26: 313-321.
83. Schwarzer HC, Peukert W. Tailoring particle size through nanoparticle precipitation. *Chem Eng Commun.* 2004; 191: 580-606.
84. Gribanov NM, Bibik EE, Buzunov OV, Naumov VN. Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. *J Magn Magn Mater.* 1990; 85: 7-10.
85. Tartaj P, Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Gonzalez-Carreno T, Serna CJ. Synthesis, properties and biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Handbook of Magnetic Materials*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; p 403.
86. Tominaga M, Matsumoto M, Soejima K, Taniguchi I. Size control for two-dimensional iron oxide nanodots derived from biological molecules. *J Colloid Interface Sci.* 2006; 299: 761-765.
87. Itoh H, Sugimoto TJ. Systematic control of size, shape, structure, and magnetic properties of uniform magnetite and maghemite particles. *J Colloid Interface Sci.* 2003; 265: 283-295.
88. Thapa D, Palkar VR, Kurup MB, Malik SK. Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. *Mater Lett.* 2004; 58, 2692-2701.
89. Pardoe H, Chua-anusorn W, St. Pierre TG, Dobson J. Structural and magnetic properties of nanoscale iron oxide particles synthesized in the presence of dextran and polyvinyl alcohol. *J Magn Magn Mat.* 2001; 225: 41-46.
90. Sangregorio C, Wiemann JK, O'Connor CJ, Rosenzweig Z. A new method for the synthesis of magnetoliposomes. *J Appl Phys.* 1999; 85: 5699-5701.
91. De Cuyper M, Joniau M. Mechanistic aspects of the adsorption of phospholipids onto lauric acid stabilized magnetite nanocolloids. *Langmuir.* 1991; 7: 647-652.
92. Pileni MP, Duxin N. Micelle technology for magnetic nanosized alloys and composites. *Chem Innov.* 2000; 30: 25-33.
93. Willard MA, Kurihara LK, Carpenter EE, Calvin S, Harris VG. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*; Nalwa, H. S., Ed.; American Scientific Publishers: Valencia, CA, 2004; Vol. 1, p 815.

94. Chen D, Xu R. Hydrothermal synthesis and characterization of nanocrystalline Fe_3O_4 powders. *Mater Res Bull.* 1998; 33: 1015-1021.
95. Hyeon T, Seong Lee S, Park J, Chung Y, Na HB. Synthesis of highly crystalline and monodisperse maghemite nanocrystallites without a size-selection process. *J Am Chem Soc.* 2001; 123: 12798-801.
96. Dai Z, Meiser F, Möhwald HJ. Nanoengineering of iron oxide and iron oxide/silica hollow spheres by sequential layering combined with a sol-gel process. *Colloid Interface Sci.* 2005; 28: 298-300.
97. Duraes L, Costa BFO, Vasques J, Campos J, Portugal A. Phase investigation of as-prepared iron oxide/hydroxide produced by sol-gel synthesis. *Mater Lett.* 2005; 59: 859-863.
98. Ismail AA. Synthesis and characterization of $\text{Y}_2\text{O}_3/\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$ nanoparticles by sol-gel method. *Appl Catal B.* 2005; 58: 115-121.
99. Cannas C, Gatteschi D, Musinu A, Piccaluga G, Sangregorio CJ. Structural and Magnetic Properties of Fe_2O_3 Nanoparticles Dispersed over a Silica Matrix. *Phys Chem.* 1998; 102: 7721-7726.
100. Ennas G, Musinu A, Piccaluga G, Zedda D, Gatteschi D, Sangregorio C, Stanger JL, Concas G, Spano G. Characterization of Iron Oxide Nanoparticles in an $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ Composite Prepared by a Sol-Gel Method. *Chem Mater.* 1998; 10: 495-502.
101. Brinker CJ, Sherrer GW. *Sol-Gel Science.* Academic Press: New York, 1990.
102. da Costa GM, De Grave E, de Bakker PMA, Vandeberghe REJ. Synthesis and Characterization of Some Iron Oxides by Sol-Gel Method. *Solid State Chem.* 1994; 113: 405-412.
103. Fievet F, Lagier JP, Blin B, Beaudoin B, Figlarz M. Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. *Solid State Ionics.* 1989; 32: 198-205.
104. Tzitzios VK, Petridis D, Zafropoulou I, Hadjipanayis G, Niarchos D. Synthesis and characterization of L10 FePt nanoparticles from Pt- Fe_3O_4 core-shell nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2005; 294: 95-98.
105. Chow GM, Kurihara LK, Schoen PE. U.S. Patent 6,436,167, 2002; Chem. Abstr. 2003, 137, 173223.
106. Yu S, Chow GMJ. Synthesis of monodisperse iron oxide and iron/iron oxide core/shell nanoparticles via iron-oleylamine complex. *Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6: 2135-40.
107. Jézéquel D, Guenot J, Jouini N, Fiévet FJ. Submicrometer zinc oxide particles: elaboration in polyol medium and morphological characteristics. *Mater Res.* 1995; 10: 77-83.
108. Alvarez GS, Muhammed M, Zagorodni A. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. *Chem Eng Sci.* 2006; 61: 4625-4633.

109. Cabrera L, Gutiérrez S, Menéndes N, Morales MP, Herrasti P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochimica Acta*. 2008; 53: 3436-3441.
110. Marques RFC, García C, Lecante P, Ribeiro JL, Noé L, Silva NJO, Amaral VS, Millan A, Verelst M. Electro-precipitation of Fe₃O₄ nanoparticles in etanol. *J Magn Magn Mater*. 2008; 320: 2311-2315.
111. Pecharroman C, Gonzalez-Carreno T, Iglesias JE. The infrared dielectric properties of maghemite, γ -Fe₂O₃, from reflectance measurement on pressed powders. *Phys Chem Miner*. 1995; 22: 21-29.
112. Puntos VF, Krishnan K M, Alivisatos AP. Synthesis of colloidal cobalt nanoparticles with controlled size and shape. *Top Catal*. 2002; 19: 145-148.
113. Rotstein, H. G.; Tannenbaum, R. Cluster Coagulation and Growth Limited by Surface Interactions with Polymers. *J Phys Chem B*. 2002; 106: 146-151.
114. Park SJ, Kim S, Lee S, Khim ZG, Char K, Hyeon T. Synthesis and magnetic studies of uniform iron nanorods and nanospheres. *J Am Chem Soc*. 2000; 122: 8581-8582.
115. Derjaguin BV, Landau L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochim URSS*. 1941; 14: 633-662.
116. Verwey EJW, Overbeek JTG. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1948.
117. Vincent B, Edwards J, Emmett S, Jones A. Depletion flocculation in dispersions of sterically-stabilized particles (soft spheres). *Colloids Surf*. 1986; 18: 261-286.
118. Cornell, RM, Schertmann U. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*; VCH Publishers, Weinheim, Germany, 1991.
119. Mak SY, Chen DH: Binding and sulfonation of poly(acrylic acid) on iron oxide nanoparticles: a novel, magnetic, strong acid cation nanoadsorbent. *Macromol Rapid Comm*. 2005; 26: 1567-1571.
120. Hong RY, Feng B, Chen LL, Liu GH, Li HZ, Zheng Y, Wei DG. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Biochem Eng J*. 2008; 42: 290-300.
121. Wang X, Zhou L, Ma Y, Li X, Gu H. Control of aggregation size of polyethyleneimine-coated magnetic nanoparticles for magnetofection. *Nano Res*. 2009; 2: 365-372.
122. Santra S, Tapeç C, Theodoropoulou N, Dobson J, Hebard A, Tan W. Synthesis and characterization of silica-coated iron oxide nanoparticles in microemulsion: The effect of non-ionic surfactants. *Langmuir*. 2001; 17: 2900-2906.
123. Lu A-H, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. *Angew Chem Int Ed*. 2007; 46: 1222-1244.
124. Mandal M, Kundu S, Ghosh SK, Panigrahi S, Sau TK, Yusuf SM, Pal T. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell. *J Colloid Interface Sci*. 2005; 286: 187-194.

125. Hoskins C, Min Y, Gueorguieva M, McDougall C, Volovick A, Prentice P, Wang Z, Melzer A, Cuschieri A, Wang L. Hybrid gold-iron oxide nanoparticles as a multifunctional platform for biomedical application. *J Nanobiotech.* 2012; 10: 27.
126. Zhang C, Wangler B, Morgenstern B, Zentgraf H, Eisenhut M, Untenecker H, Kruger R, Huss R, Seliger C, Semmler W, Kiessling F. Silica- and alkoxy silane-coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imagin. *Langmuir.* 2007; 23: 1427-34.
127. Mulvaney P, Liz-Marzan LM, Giersig M, Ung T. Silica encapsulation of quantum dots and metal clusters. *J Mater Chem.* 2000; 10: 1259-70.
128. Chen M, Yamamuro S, Farrell D, Majetich SA. Gold-coated iron nanoparticles for biomedical applications. *J Appl Phys.* 2003; 93: 7551-3.
129. Zhou WL, Carpenter EE, Lin J, Kumbhar A, Sims J, O'Connor CJ. Nanostructures of gold coted iron core-shell nanoparticles and the nanobands assembled under magnetic field. *Eur Phys J D.* 2001; 16: 289-292.
130. Alcala MD, Real C. Synthesis based on the wet impregnation method and characterization of iron and iron oxide-silica nanocomposites. *Solid State Ionics.* 2006; 177: 955-960.
131. Gushikem Y, Rosatto SS. Metal oxide thin films grafted on silica gel surfaces: recent advances on the analytical application of these materials. *J Braz Chem Soc.* 2001; 12: 695-705.
132. Woo K, Hong J, Ahn JP. Synthesis and surface modification of hydrophobic magnetite toprocessible magnetiteilica-propilamine. *J Magn Magn Mater.* 2005; 293: 177-181.
133. Lesnikovich AE, Shunkevich TM, Naumenko VN, Vorobyova SA, Baykov MW. Dispersity of magnetite in magnetic liquids and the interaction with a surfactant. *J Magn Magn Mater.* 1990; 17: 7907-7911.
134. Sun Y, Duan L, Guo Z, DuanMu Y, Ma M, Xu L, Zhang Y, Gu N. An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application. *J Magn Magn Mater.* 2005; 285: 65-70.
135. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interface Sci.* 1968; 26: 62-69.
136. Deng YH, Wang CC, Hu JH, Yang WL, Fu SK. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach. *Colloids Surf A.* 2005; 262: 87-93.
137. Im SH, Herricks T, Lee YT, Xia Y. Synthesis and characterization of monodisperse silica colloids loaded with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chem Phys Lett.* 2005; 401: 19-23.
138. Butterworth MD, Bell SA, Armes SP, Simpson AW. Synthesis and Characterization of Polypyrrole– Magnetite–Silica Particles. *J Colloid Interface Sci.* 1996; 183: 91-99.
139. Liu X, Ma Z, Xing J, Liu H. Preparation and characterization of amino-silane modified superparamagnetic silica nanospheres. *J Magn Magn Mater.* 2004; 270: 1-6.

140. Liu X, Xing J, Guan Y, Shan G, Liu H. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic silica supports and their use for protein immobilization. *Colloids Surf A*. 2004; 238: 127-131.
141. Tartaj P, Serna C. Microemulsion-assisted synthesis of tunable superparamagnetic composites. *J Chem Mater*. 2002; 14: 4396-4402.
142. Gao X, Yu KMK, Tamb KY, Tsang SC. Colloidal Stable Silica Encapsulated Nano-Magnetic Composite as a Novel Bio-Catalyst Carrier. *Chem Comm*. 2003; 24: 2998-2999.
143. Ulman A. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev*. 1996; 96: 1533-1554.
144. Liu Q, Finch JA, Egerton R. A novel two-step silica-coating process for engineering magnetic nanocomposites. *Chem Mater*. 1998; 10: 3936-3940.
145. Mornet S, Portier J, Duguet E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J Magn Magn Mater*. 2005; 293: 127-134.
146. del Campo A, Sen T, Lellouche JP, Bruce IJ. Multifunctional magnetite and silica-magnetite nanoparticles: Synthesis, surface activation and applications in life sciences. *J Magn Magn Mater*. 2005; 293: 33-40.
147. Yamaura M, Camilo RL, Sampaio LC, Macedo MA, Nakamura M, Toma HE. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2004; 279: 210-217.
148. Lin J, Zhou W, Kumbhar A, Fang J, Carpenter EE, O'Connor CJ. Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-Assembly. *J Solid State Chem*. 2001; 159: 26-31.
149. Goon IY, Lai LMH, Lim M, Munroe P, Gooding JJ, Amal R. Fabrication and dispersion of gold shell-protected magnetite nanoparticles: systematic control using polyethylenimine. *Chem Mater*. 2009; 21: 673-681.
150. Wang L, Luo J, Fan Q, Suzuki M, Suzuki IS, Engelhard MH, Lin Y, Kim N, Wang JQ, Zhong CJ. Monodispersed core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles. *J Phys Chem B*. 2005; 109: 21593-21601.
151. Huang C, Jiang J, Muangphat C, Sun X, Hao Y. Trapping iron oxide into hollow gold nanoparticles. *Nanoscale Res Lett*. 2011; 6: 1-5.
152. Palmacci S, Josephson L, Groman EV. U.S. Patent 5,262,176, 1995; *Chem. Abstr*. 1996, 122, 309897.
153. Arshady R. Radiolabeled and Magnetic Particles in Medicine and Biology; Citrus Books: London, U.K., 2001; Vol. 3.
154. Okassa LN, Marchais H, Douziech-Eyrolles L, Cohen-Jonathan S, Souce M, Dubois P, Chourpa I. Development and characterization of sub-micron poly(D,L-lactide-co-glycolide) particles loaded with magnetite/maghemite nanoparticles. *Int J Pharm*. 2005; 302: 187-196.
155. Berry CC, Wells S, Charles S, Curtis ASG. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblast *in vitro*. *Biomaterials*. 2003; 23: 4551-4557.

156. Gamarra LF, Brito GES, Pontuschka WM, Amaro E, Parma AHC, Goya GF. Biocompatible superparamagnetic iron oxide used for contrast agents: a structural and magnetic study. *J Magn Magn Mater*. 2005; 289: 439-441.
157. Paul KG, Frigo TB, Groman JY, Groman EV. Synthesis of ultrasmall superparamagnetic iron oxides using reduced polysaccharides. *Bioconjugate Chem*. 2004; 15: 394-401.
158. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory and practice. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 283-318.
159. Sairam M, Naidu BVK, Nataraj SK, Sreedhar B, Aminabhavi TM. Poly (vinyl alcohol)-iron oxide nanocomposite membranes for pervaporation dehydration of isopropanol, 1, 4-dioxane and tetrahydrofuran. *J Membr Sci*. 2006; 283: 65-73.
160. Schöpf B, Neuberger T, Schulze K, Petri A, Chastellain M, Hofmann M, Hofmann H, von Rechenberg B. Methodology description for detection of cellular uptake of PVA coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) in synovial cells of sheep. *J Magn Magn Mater*. 2005; 293: 411-418.
161. Arbab AS, Bashaw LA, Miller BR, Jordan EK, Lewis BK, Kalish H, Frank JA. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*. 2003; 229: 838-846.
162. Nishio Y, Yamada A, Ezaki K, Miyashita Y, Furukawa H, Horie K. Preparation and magnetometric characterization of iron-oxide containing alginate/ poly(vinyl alcohol) networks. *Polymer*. 2004; 45: 7129-7136.
163. Finotelli PV, Morales MA, Rocha-Leao MH, Baggio-Saitovitch EM, Rossi AM. Magnetic Studies of Iron (III) Nanoparticles in Alginate Polymer for Drug Delivery Applications. *Mater Sci Eng*. 2004; 24: 625-629.
164. Sipos P, Berkesi O, Tombacz E, St. Pierre TG, Webb J. Formation of spherical iron (III) oxyhydroxide nanoparticles sterically stabilized by chitosan in aqueous solutions. *J Inorg Biochem*. 2003; 95: 55-63.
165. Bhattarai SR, Bahadur KC, Aryal S, Khill MS, Kim HY. N-Acylated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a novel nano-matrix and ceramic modification. *Carbohydr Polym*. 2007; 69: 467-477.
166. Moeser GD, Green WH, Laibinis PE, Linse P, Hatton TA. Structure of polymer-stabilized magnetic fluids: small-angle neutron scattering and mean-field lattice modeling. *Langmuir*. 2004; 20: 5223-5234.
167. Sun S, Anders S, Hamann HF, Thiele JU, Baglin JEE, Thomson T, Fullerton EE, Murray CB, Terris BD. Polymer mediated self-assembly of magnetic nanoparticles *J Am Chem Soc*. 2002; 124: 2884-2885.
168. Gomez-Lopera SA, Plaza RC, Delgado AV. Synthesis and characterization of spherical magnetite/ biodegradable polymer composite particles. *J Colloid Interface Sci*. 2001; 240: 40-47.
169. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010; 375:1557-1568.

170. Kuehnert MJ, Kruszon-Moran D, Hill HA, McQuillan G, McAllister SK, Fosheim G. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001-2002. *J Infect Dis* 2006; 193:172-179.
171. Wyllie DH, Crook DW, Peto TEA. Mortality after *Staphylococcus aureus* bacteraemia in two hospitals in Oxfordshire, 1997-2003: cohort study. *BMJ*. 2006; 333: 281-284.
172. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 2010; 7: e1000215.
173. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 53-59.
174. Pinho MG, Filipe SR, de Lencastre H, Tomasz A. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 2001; 183: 6525-31.
175. Cercenado E, Luis de Gopegui E. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina de origen comunitario. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008; 26: 19-24.
176. Obed M, García-vidal C, Pessacq P, Mykietiuik A, Viasus D, Cazzola L, Domínguez MA, Clamaggi A, Carratalà J. Características clínicas y pronóstico de la neumonía adquirida en la comunidad causada por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013; 32: 23-27.
177. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 222-235.
178. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, Friedrich AW, Kearns AM, Westh H, MacKenzie FM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 39: 273-282.
179. Engemann JJ, Carmeli Y, Cosgrove SE, Fowler VG, Bronstein MZ, Trivette SL, Briggs JP, Sexton DJ, Kaye KS. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 592-598.
180. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, JM Boyce, Farr BM. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003; 24: 362-386.

181. Association for Professionals in Infection Control & Epidemiology, Inc (APIC). National prevalence study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in U.S. healthcare facilities. Executive summary. June 25, 2007.
182. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S, Harrison LH, Lynfield R, Dumyati G, Townes JM, Craig AS, Zell ER, Fosheim GE, McDougla LK, Carey RB, Fridkin SK. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763-1771.
183. Witte W. Nosocomial and community MRSA infections. EH ONLINE. <http://www.europhospital.com/topics/article/4288.html>. Accessed November 7, 2008.
184. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, Sweden: ECDC; 2010.
185. Jain KK. Current trends in molecular diagnostics. Med Device Technol. 2002; 13:14–18.
186. Lubeck PS, Hoorfar J. PCR technology and applications to zoonotic food-borne bacterial pathogens. Methods Mol Biol. 2003; 216: 65–84.
187. Wolk D, Mitchel S, Patel R. Principles of molecular microbiology testing methods. Infect Dis Clin North Am. 2001; 15:1157–1204.
188. Luque J, Herráez A. Biología molecular e ingeniería genética. MMI Elsevier España. 2002.
189. E. Van Pelt-Verkuil, Alex van Belkum, John P. Hays, Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, © Springer Science + Business Media B.V. 2008.
190. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York, 1990.
191. Higuchi R, Fokler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology. 1993; 11: 1026-30.
192. F. Watzinger, K. Ebner, T. Lion. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. Molecular Aspects of Medicine. 2006; 27: 254–298.
193. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques. 1998, 24: 954–962.
194. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res. 2004; 32: e103.
195. Varela-Ledo E, Romero-Yuste S, Ordóñez-Barbosa P, Romero-Jung P, Prieto-Rodríguez E, Aguilera-Guirao A, Regueiro-García B. CMV DNA detection in plasma using real-time PCR based on the SYBR-Green I dye method. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006, 24: 541-545.
196. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjobak R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg R, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006; 27: 95-125.

197. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 50–30 exonuclease activity of thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 7276–7280.
198. Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004; 22: 299-305.
199. Caplin BD, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCycler™—Hybridization probes. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection. *Biomedica*. 1999; 1: 5–8.
200. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 303–308.
201. Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol*. 1998; 16: 49–53.
202. Heather D, VanGuilder, Kent E, Vrana, Willard M, Freeman. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*. 2008; 44: 619–626.
203. Speers DJ. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. *Clin Biochem Rev*. 2006; 27: 39-51.
204. Tang YW, Procop GW, H PD. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem*. 1997; 43: 2021-38.
205. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 1993; 262: 914-7.
206. Keer JT, Birch L. Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*. 2003; 53: 175– 183.
207. Blackburn CW, McCarthy JD. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured *Escherichia coli* O157:H7 in foods. *Int J Food Microbiol*. 2000; 55: 285–290.
208. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveals numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 1990; 345: 63–65.
209. Caron GN, Stephens P, Badley RA. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J Appl Microbiol*. 1998; 84: 988– 998.
210. Turner K, Porter J, Pickup R, Edwards C. Changes in viability and macromolecular content of long-term batch cultures of *Salmonella typhimurium* measured by flow cytometry. *J Appl Microbiol*. 2000; 89: 90–99.
211. del Mar Lleó , M., Pierobon, S., Tafi, M.C., Signoretto, C., Canepari, P. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66: 4564– 4567.
212. Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 1313– 1318.

213. Jamil S, Keer JT, Lucas SB, Dockrell HM, Chiang TJ, Hussain R, Stoker NG. Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. *Lancet*. 1993; 342: 264–268.
214. Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol*. 1994; 77: 73–79.
215. Deere D, Porter J, Pickup RW, Edwards C. Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *J Appl Bacteriol*. 1996; 81: 309–318.
216. Hellyer TJ, DesJardin LE, Hehman GL, Cave MD, Eisenach KD. Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 290–295.
217. Soejima T, Minami JJ, Yaeshima T, Iwatsuki K. An advanced PCR method for the specific detection of viable total coliform bacteria in pasteurized milk. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012; 95: 485–497.
218. Sheridan GEC, Masters JA, Shallcross JA, Mackey BM. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 1313–1318.
219. Vaitilingom M, Gender F, Pierre Brignon P. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64: 1157–1160.
220. Fittipaldi M, Codony F, Adrados B, Camper AK, Morató J. Viable Real-Time PCR in Environmental Samples: Can All Data Be Interpreted Directly? *Microb Ecol*. 2011; 61: 7–12.
221. Lu Y, Yang W, Shi L, Li L, Alam MJ, Guo A, Miyosi S. Specific detection of viable *Salmonella* cells by an ethidium monoazide-loop mediated isothermal amplification (EMA-LAMP) method. *J Health Sci*. 2009; 55: 820–824.
222. Liu YH, Wang CH, Wu JJ, Lee GB. Rapid detection of live methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by using an integrated microfluidic system capable of ethidium monoazide pre-treatment and molecular diagnosis. *Biomicrofluidics*. 2012; 6: 034119.
223. Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, Holck AL. Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Appl Environ Microbiol*. 2005; 71: 1018–1024.
224. House DL, Chon CH, Creech CB, Skaar EP, Li D. Miniature on-chip detection of unpurified methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) DNA using real-time PCR. *J Biotechnol*. 2010; 146: 93–99.
225. DeTraglia MC, Brand JS, Tometski AM. Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labelling for trypsin. *J Biol Chem*. 1978; 253: 1846.
226. Nocker A, Camper AK. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 291: 137–142.

227. Elizaquível P, Aznar R, Sanchez G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol.* 2014; 116: 1-13.
228. Nogva HK, Dromtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques.* 2003; 34: 804-813.
229. Nocker A, Camper AK. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 1997-2004.
230. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006; 67: 310-320.
231. Cawthorn DM, Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol.* 2008; 105: 1178-1185.
232. Levin RE, Lee JL. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets. *J Microbiol Methods.* 2009; 76: 93-96.
233. Elizaquível P, Sanchez G, Aznar R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control.* 2012; 25: 704-708.
234. Lovdal T, Hovda MB, Bjorkblom B, Moller SG. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J Microbiol Methods.* 2011; 85: 164-169.
235. Cenciarini-Borde C, Courtois S, La Scola B. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiology.* 2009; 4: 45-64.
236. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods.* 2012; 91: 276-289.
237. van Frankenhuyzen JK, Trevors JT, Lee H, Flemming CA, Habash MB. Molecular pathogen detection in biosolids with a focus on quantitative PCR using propidium monoazide for viable cell enumeration. *J Microbiol Methods.* 2011; 87: 263-272.
238. Hammes F, Berney M, Egli, T. Cultivation-independent assessment of bacterial viability. *Adv Biochem Eng Biotech.* 2011; 124: 123-150.
239. Cangelosi GA, Meschke JS. Dead or Alive: Molecular Assessment of Microbial Viability. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 5884-5891.
240. Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods.* 2007; 70: 252-260.
241. Wuertz BS. Discrimination of viable and dead fecal bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 2940-2944.

242. Delgado Viscogliosi P, Solignac L, Delattre JM. Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 3502–3512.
243. Nocker A, Caspers M, Esveld-Amanatidou A, Van DV, Schuren F, Montijn R, Kort R. Multiparameter viability assay for stress profiling applied to the food pathogen *Listeria monocytogenes* F2365. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 6433–6440.
244. Kramer M, Obermajer N, Bogovic MB, Rogelj I, Kmetec V. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. *Appl Microbiol Biotech.* 2009; 84: 1137–1147.
245. Wilson, IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63: 3741–3751.
246. Fittipaldi M, Pino Rodriguez NJ, Adrados B, Agusti G, Penuela G, Morato J, Codony F. Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction. *J Eukaryot Microbiol.* 2011; 58: 359–364.
247. Elizaquível P, Gabaldon JA, Aznar R. Quantification of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control.* 2011; 22: 158–164.
248. Maurer JJ. The mythology of PCR: a warning to the wise. In *PCR Methods in Foods* ed. Maurer, J.J., pp. 27–40. New York, NY: Springer. 2006.
249. Slimani S, Robyns A, Jarraud S, Molmeret M, Dusserre E, Mazure C, Facon JP, Lina G. Evaluation of propidium monoazide (PMA) treatment directly on membrane filter for the enumeration of viable but non cultivable *Legionella* by qPCR. *J Microbiol Methods.* 2012; 88: 319–321.
250. Zhu RG, Li TP, Jia YF, Song LF. Quantitative study of viable *Vibrio parahaemolyticus* cells in raw seafood using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods.* 2012; 90: 262–266.
251. Soejima T, Iida KI, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida SI. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2305–2313.
252. Soejima T, Schlitt-Dittrich F, Yoshida SI. PCR amplification-length-dependent etidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. *Anal Biochem.* 2011; 418: 37–43.
253. Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods.* 2011; 87: 89–95.
254. Martin B, Raurich S, Garriga M, Aymerich T. Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham. *Food Analytical Methods.* 2013; 6: 683–690.
255. Kiho Kang, Jinsub Choi, Joong Hee Nam, Sang Cheon Lee, Kyung Ja Kim, Sang-Won Lee, and Jeong Ho Chang. Preparation and Characterization of Chemically

- Functionalized Silica-Coated Magnetic Nanoparticles as a DNA Separator. *J Phys Chem B*. 2009; 113: 536–543.
256. Adachi A, Gendelman H.E., Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol*. 1986; 59: 284-291.
 257. Abad ML, Verdura T, Vela A, Iglesias MJ, Gutiérrez D, Veiga M, Aguilera A, Regueiro BJ. Construction and Characterization of a Minimized Version of the HIV-1 pNL4-3 Plasmid and Its Application for Pseudotyping HIV-1 Vectors. *Mol Biotech*. 2004; 28: 87-95.
 258. Milheiro C, Oliveira DC, de Lencastre H. Update to the Multiplex PCR Strategy for Assignment of *mec* Element Types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 3374–7.
 259. Clinical and Laboratory Standards Institute / NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. 2013. CLSI Document M100-S23; Vol. 33 No. 3.
 260. Kloos WE, Bannerman TL. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, p. 264-282. In P.R. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover and R.H. Tenover, *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 261. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections. *Chest*. 1999; 115: 462–474.
 262. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *Am J Medicine*. 2003; 115: 529–535.
 263. Naml S, Kwon S, Kim MJ, Chae JC, Maeng PJ, Park JG, Lee GC. Selective detection of viable *Helicobacter pylori* using ethidium monoazide or propidium monoazide in combination with real-time polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol*. 2011; 55: 841–846.
 264. Hobbs JK, Miller K, O'Neill AJ, Chopra. Consequences of daptomycin-mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chem*. 2008; 62: 1003–1008.
 265. Jung D, Rozek A, Okon M. Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem Biol*. 2004; 11: 949–57.
 266. Straus SK, Hancock RE. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758: 1215–23.
 267. Ilias Stefanos, Gregor Dubois, Sylvia Tigrett, Estelle Lucarz and Francisco Veas (2011). Apolipoprotein H, an Acute Phase Protein, a Performing Tool for Ultra-Sensitive Detection and Isolation of Microorganisms from Different Origins, Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases, Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307-873-1, InTech.

268. Stefas E, Rucheton M, Graafland H, Moynier M, Sompeyrac C, Bahraoui EM, Veas F. Human plasmatic apolipoprotein H binds human immunodeficiency virus type 1 and type 2 proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1997; 13(1):97-104.
269. Stefas I, Rucheton M, D'Angeac AD, Morel-Baccard C, Seigneurin JM, Zarski JP, Martin M, Cerutti M, Bossy JP, Misse D, Graafland H, Veas F. Hepatitis B virus Dane particles bind to human plasma apolipoprotein H. *Hepatology*. 2001; 33:207-217.
270. Zhang L, Jacobsson K, Ström K, Lindberg M, Frykberg L. *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and beta2-glycoprotein I. *Microbiology*; 1999; 145:177-183
271. Agar C, G. de Groot P, Mörgelin M, Monk D, Van Os Johannes G, de Laat B, Urbanus P, Herwald H, Van der Poll T, Meijers J. β 2-glycoprotein I: a novel component of innate immunity. *Blood* 2011; 117: 6939-6947.
272. Bouma B, de Groot PG, van den Elsen JM, Ravelli RB, Schouten A, Simmelink MJ, Derksen RH, Kroon J, Gros P. Adhesion mechanism of human beta (2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *The Embo Journal*. 1999; 18: 5166-5174.
273. Gambino R, Rui G, Pagano G, Cassader M. The binding of apolipoprotein H (beta2-Glycoprotein I) to lipoproteins. *Prostaglandins and other Lipid Mediators*. 1999; 57: 351-359.
274. Polz E, Kostner GM. The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions. *FEBS Letters*. 1979; 102: 183-186.
275. Schultze HE. (1961). [Glycoproteins of human plasma.]. *Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften*. 1961; 17: 77-91.